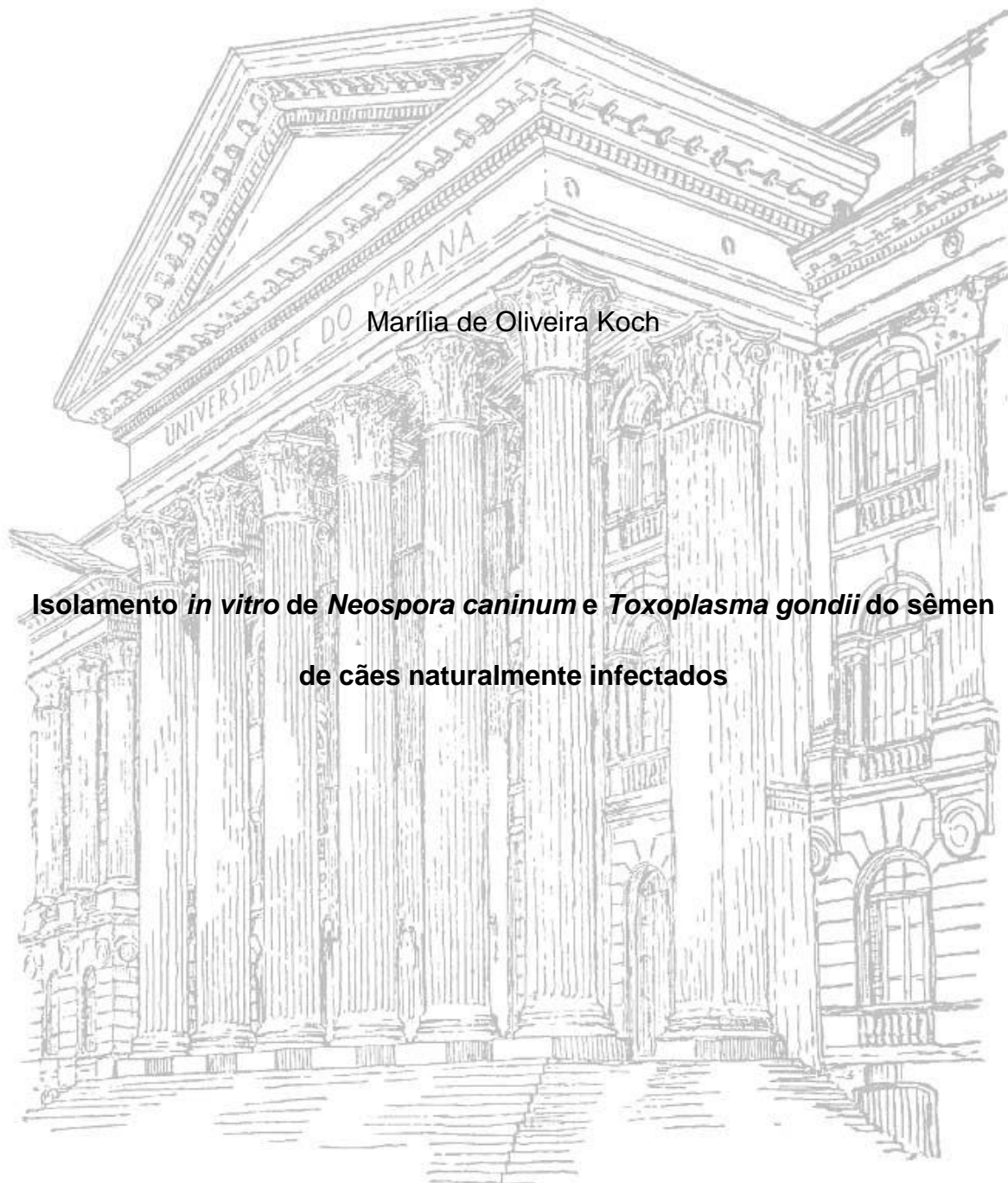


Universidade Federal do Paraná

Setor de Tecnologia

**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia**



Marília de Oliveira Koch

**Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen
de cães naturalmente infectados**

CURITIBA

2014

MARILIA DE OLIVEIRA KOCH

**Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen
de cães naturalmente infectados**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre no curso de
Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos
e Biotecnologia, área de concentração: Saúde
Animal e Humana, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Rosangela Locatelli
Dittrich

CURITIBA

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Romildo Romualdo Weiss pela oportunidade, orientação e ensinamentos.

À Professora Dra. Rosangela Locatelli Dittrich pelo apoio, incentivo, orientação, correções e por todos os ensinamentos transmitidos durante todos estes anos.

Agradeço à minha mãe Lea Sandra Koch, minha tia Sônia Lins Stroud e minha irmã Tawana de Oliveira Koch por estarem sempre presentes.

Agradeço a todos do laboratório de Patologia Clínica Veterinária do HV – UFPR, em especial ao Olair Carlos Beltrame, Carlos Czapak Kroetz, Rafael Hideki Hagi, Fred Fontanelli Vaz, Luciane Laskoski e Andréa Meirelles, obrigada pela companhia, amizade e apoio.

Às pós graduandas Melina A. Formighieri Bertol e Renata Azevedo de Abreu pelo apoio e pela aula prática de coleta de sêmen.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA:	11
Neosporose e Toxoplasmose: aspectos gerais, vias de transmissão e impacto na reprodução canina	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
1 Neosporose	14
1.1 Introdução	14
1.2 Classificação do parasito.....	14
1.3 Ciclo e hospedeiros.....	15
1.4 Vias de transmissão	17
1.5 Impacto na reprodução canina.....	20
1.6 Diagnóstico	22
2 Toxoplasmose	24
2.1 Introdução	24
2.2 Classificação do parasito.....	25
2.3 Ciclo e hospedeiros.....	25
2.4 Vias de transmissão	27
2.5 Impacto na reprodução canina	31
2.6 Diagnóstico	32
REFERÊNCIAS.....	34

CAPÍTULO II – Isolamento <i>in vitro</i> de <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> do sêmen de cães naturalmente infectados	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
1.1 OBJETIVO GERAL.....	52
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 ÁREAS GEOGRÁFICAS E ANIMAIS	54
2.2 AMOSTRAS	54
2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	55
2.3.1 Sorológico	55
2.3.2 Citológico.....	56
2.3.3 Isolamento <i>in vitro</i>	56
2.3.3.1 Processamento das amostras de sêmen para isolamento	56
2.3.3.2 Cultivo de células Vero	57
2.3.4 Caracterização Molecular de <i>Neospora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i>	59
2.3.4.1 Extração de DNA.....	60
2.3.4.2 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR	60
2.3.4.3 Solução de amplificação da PCR.....	61
2.3.4.4 Amplificação do DNA.....	64
2.3.5 Identificação dos produtos da PCR.....	64
2.3.6 PCR da região ITS1.....	65
2.3.7 Produtos amplificados obtidos da região ITS1 submetidos ao sequenciamento para confirmar a identidade de <i>T. gondii</i> e/ou <i>N. caninum</i>	65
2.4 Criopreservação dos protozoários	66
3 RESULTADOS	66
3.1 Diagnóstico Sorológico	66
3.2 Análise citológica do sêmen	67
3.3 Isolamento <i>in vitro</i>	68
3.4 Caracterização dos isolados pela reação da polimerase em cadeia – PCR	70
3.5 Análise das sequências nucleotídicas da região ITS1	74

4	DISCUSSÃO.....	75
5	CONCLUSÃO.....	78
6	PERSPECTIVAS	78
	REFERÊNCIAS.....	80
	ANEXOS	86

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA - Neosporose e Toxoplasmose: aspectos gerais, vias de transmissão e impacto na reprodução canina

Figura 1 – Ciclo de vida e transmissão do *Neospora caninum* através da eliminação de oocistos por fezes de cães, coiotes e dingos, e a ingestão dos oocistos esporulados pelos hospedeiros intermediários. Os hospedeiros se contaminam pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos. A transmissão congênita ocorre com a forma de taquizoítos (esquerda). Fonte: CARDOSO (2010)..... 16

Figura 2 – Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* ocorre por transmissão de oocistos nas fezes de gatos e a ingestão dos oocistos pelos hospedeiros intermediários. Os dias indicam o tempo entre a ingestão do *Toxoplasma gondii* pelo gato até sua eliminação pelas fezes. Os ratos representam os vários hospedeiros intermediários (FRENKEL, DUBEY & MILLER, 1970)..... 26

Figura 3 – Transmissão da toxoplasmose. Os oocistos são eliminados pelas fezes dos gatos e outros felídeos, após a esporulação são infecciosos para uma grande variedade de hospedeiros intermediários. Carnivorismo é uma importante forma de transmissão (esquerda). Transmissão transplacentária é demonstrada abaixo (FRENKEL, 1973a)..... 28

CAPÍTULO II – Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados

Figura 1 – Monocamada de célula Vero infectada com isolado NC S1 (PR). Presença de efeito citopático com áreas de rompimento celular (seta). Microscópio invertido (200 X) 69

Figura 2 - Monocamada de células Vero mantida como controle negativo durante o período de isolamento *in vitro* dos protozoários (200 X) 70

Figura 3 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *N. caninum* (*primers* Np6/Np21) amplificado de amostras de sêmen de cães e de isolados do sêmen 73

Figura 4 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *T. gondii* (*primers* TOX4/TOX5) amplificado de amostras e de isolados do sêmen 74

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II – Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados

Tabela 1 – Regiões geográficas para o estudo sorológico e seleção de cães para o isolamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no sêmen 54

Tabela 2 – Especificações dos *primers* utilizados na reação da polimerase em cadeia para identificação de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* 61

Tabela 3 – Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Neospora caninum* e respectivas concentrações na reação com os *primers* Np6/Np21 63

Tabela 4 – Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* e respectivas concentrações na reação com os *primers* TOX4/TOX5 63

Tabela 5 – Titulação realizada pela técnica de imunofluorescência indireta com detecção de anticorpos do tipo IgG anti-*Neospora caninum* e/ou anti-*Toxoplasma gondii* em onze cães com quatro coletas 67

Tabela 6 – *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* isolados do sêmen de cães, presença de efeito citopático no cultivo de célula Vero e seus respectivos períodos de isolamento que variaram de 10 a 90 dias. 68

Tabela 7 – Quantidades de DNA obtidas de amostras de sêmen íntegro de cães e do sedimento do isolamento em cultivo celular (aparelho NanoDrop 1000 Thermo Scientific®)..... 71

Tabela 8 – Resultados sorológicos para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (RIFI 1:50) e da PCR em amostras de sêmen íntegro de cão e sedimento dos isolados obtidos em cultivo de célula Vero 72

Tabela 9 – Sequência obtida do produto de amplificação da região ITS1 com o primer ITS2 74

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

UFPR	- Universidade Federal do Paraná
PR	- Paraná
SC	- Santa Catarina
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
RNA	- Ácido ribonucléico
rDNA	- Ácido Desoxirribonucleico Ribossômico
PCR	- “Polymerase Chain Reaction”
RIFI	- Reação de Imunofluorescência Indireta
ELISA	- “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
BLAST	- “Basic Local Alignment Search Tool”
PBS	- “Phosphate Buffered Saline”
CO ₂	- Dióxido de Carbono
UI	- Unidades Internacionais
pH	- Potencial Hidrogeniônico
dNTPs	- “Desoxirribonucleotídeos Fosfatados”
dATP	- “DesoxiAdenosina Trifosfatada”
dCTP	- “DesoxiCitidina Trifosfatada”
dGTP	- “DesoxiGuanosina Trifosfatada”
dTTP	- “DesoxiTimidina Trifosfatada”
Taq	- “Thermus aquaticus”
UV	- Ultravioleta

TAE	- Tris Acetato
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IgA	- Imunoglobulina A
IFN- γ	- Interferon-gamma
G (g)	- Força Centrífuga
q.s.p	- “Quantidade Suficiente Para”
g	- grama
ml	- mililitro
%	- porcentagem
μ l	- microlitro
°C	- grau centígrado
μ g	- micrograma
μ m	- micrômetro
pb	- par de bases
M	- molar
mM	- milimolar
μ M	- micromolar
pmol	- picomol
ng	- nanograma
Kb	- kilo pares de bases

RESUMO

Neospora caninum e *Toxoplasma gondii* são protozoários que infectam vários animais. O DNA dos parasitos foi detectado no sêmen de bovinos e homens, respectivamente, mas não há comprovação da presença desses protozoários no sêmen de cão. O cão pode ser um transmissor assintomático dos protozoários. O presente estudo aborda no capítulo I uma revisão de literatura sobre a Neosporose e Toxoplasmose, com ênfase nas vias de transmissão e o impacto na reprodução canina, e no capítulo II a investigação dos protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* em amostras de sêmen de cães naturalmente infectados por análise citológica, isolamento em cultivo celular e reação da cadeia em polimerase (PCR). Neste trabalho foram realizadas colheitas de sêmen de 11 cães clinicamente saudáveis (quatro cães soropositivos para *N. caninum*, cinco soropositivos para *T. gondii*, dois soropositivos para ambos e dois soronegativos) para realizar o isolamento *in vitro*. Os isolados obtidos em cultivo celular e amostras do sêmen *in natura* foram submetidos à amplificação por PCR utilizando iniciadores que delimitam o segmento do DNA da região Nc5 de *N. caninum* (Np6/Np21) e da região de 529 pb repetida 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* (TOX4/TOX5). Foram obtidos dois isolados de *N. caninum* e cinco de *T. gondii* confirmados pela PCR. Obteve-se amplificação do DNA de *N. caninum* em quatro amostras de sêmen, e amplificação do DNA de *T. gondii* somente nos isolados. Os parasitas estão presentes no sêmen e o isolamento e manutenção em cultivo celular comprovou sua viabilidade.

Palavras-chave: isolamento *in vitro*, sêmen, cão.

ABSTRACT

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* are protozoa that infect many animals. The DNA of parasites was detected in the semen of cattle and men, respectively, but there is no evidence of the presence of these protozoa in dog semen. The dog may be an asymptomatic protozoan transmitter. The chapter I of the present study provides a literature review about neosporosis and toxoplasmosis, with emphasis on routes of transmission and the impact on canine reproduction, and the chapter II brings the investigation of the protozoa *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in semen samples of dogs naturally infected by cytological analysis, isolation in cell culture and polymerase chain reaction (PCR). In this study semen were collected in 11 clinically healthy dog (four dogs seropositive for *N. caninum*, five seropositive for *T. gondii*, two seropositive for both and two seronegative) to perform the isolation *in vitro*. The strains obtained in cell culture and the samples of nature semen was submitted to PCR amplification using primers that define the Nc5 DNA sequence of *N. caninum* (Np6/Np21) and the 529 bp repeated 200 to 300 times the genome of *T. gondii* (TOX4/TOX5). There was obtained two strains of *N. caninum* and five strains of *T. gondii* confirmed by PCR. Was obtained four amplification of *N. caninum* DNA in semen samples and five amplification of *T. gondii* DNA only in isolated strains. The parasites are present in the semen and the isolation and maintenance in cell culture have proven their viability.

Keywords: isolation *in vitro*, semen, dog.

INTRODUÇÃO GERAL

A neosporose é causada pelo *Neospora caninum* e os hospedeiros definitivos são o cão, o dingo e o coiote. É uma doença que pode causar manifestações clínicas graves nestes animais. A infecção por *Neospora caninum* é associada a distúrbios de ordem neurológica em cães (BERTOCCO, 2008). No Paraná a soroprevalência da neosporose em cães é elevada, com relatos de 18,17% na região metropolitana de Curitiba (FRIDLUND-PLUGGE *et al.*, 2011) e em Santa Catarina a prevalência foi de 12,3% nas cidades de Lages e Balneário Camburiú (MOURA *et al.*, 2011).

A transmissão do *Neospora caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical. A transmissão horizontal ocorre quando os hospedeiros ingerem através da água e alimentos, oocistos esporulados ou tecidos com cistos com bradizoítas. A transmissão vertical, infecção congênita ou infecção via placentária ocorre quando a mãe transmite o parasito para seus descendentes, geração após geração (DUBEY *et al.*, 2007). A transmissão congênita é uma das formas mais importantes de infecção. Cadelas infectadas subcl clinicamente podem transmitir o parasito para os seus fetos e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas. Não há relatos de predisposição racial ou de sexo para a neosporose canina (DUBEY e LINDSAY, 1996). A transmissão venérea pode ocorrer em bovinos (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; PITUCO *et al.*, 2005; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e ovinos (SYED-HUSSAIN *et al.*, 2013), mas não há trabalhos investigando a transmissão venérea do *N. caninum* na espécie canina.

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii* e os hospedeiros definitivos são os felídeos. A prevalência deste parasito em cães é elevada. Na região do Paraná a soroprevalência foi de 50,89% (ZULPO *et al.*, 2012) e 46,8% (PEDRASSANI, 2001), e em Santa Catarina a prevalência foi de 22,3% (MOURA *et al.*, 2009) e 49,36% (PEDRASSANI, 2001). Devido ao elevado índice de animais naturalmente infectados por *T. gondii*, agente reconhecidamente oportunista, e sua correlação com doenças

imunossupressivas como a cinomose (MORETTI *et al.*, 2002), a ocorrência deste protozoário deve ser investigada na espécie canina.

A transmissão do *Toxoplasma gondii* também ocorre pelos mecanismos horizontal e vertical. A transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* já foi estudada no sêmen de humanos infectados (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 1996), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009), suínos (MOURA *et al.*, 2007), cães (ARANTES *et al.*, 2009), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980) e ovinos (SPENCE *et al.*, 1978, BLEWETT *et al.*, 1982, TEALE *et al.*, 1982, LOPES *et al.*, 2009, MORAES *et al.*, 2010), originando discussões sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito, porque a importância da transmissão venérea é desconhecida.

É de grande importância o estudo da via venérea de transmissão para que as medidas profiláticas sejam adotadas para o controle destas doenças. A elevada prevalência dos agentes nas regiões e as perdas reprodutivas devem ser consideradas.

O presente estudo está dividido em dois capítulos: capítulo I, com a revisão bibliográfica sobre “Toxoplasmose e Neosporose com ênfase nas vias de transmissão”, e o capítulo II com o título “Isolamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados”. O estudo foi realizado em amostras de sêmen de cães naturalmente infectados, procedentes da região de Curitiba no Paraná e de Rio Negrinho em Santa Catarina, por análise citológica, isolamento *in vitro* e reação da polimerase em cadeia (PCR).

CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA:

**Neosporose e Toxoplasmose: aspectos gerais, vias de transmissão e
impacto na reprodução canina**

RESUMO

A neosporose é uma doença causada pelo protozoário *Neospora caninum* e a toxoplasmose pelo *Toxoplasma gondii*, parasitas intracelulares obrigatórios. O *Neospora caninum* e o *Toxoplasma gondii* causam aborto, mortalidade neonatal e doenças neurológicas. Os protozoários são transmitidos por dois mecanismos: via horizontal e vertical. Existem evidências sobre a possível transmissão venérea (horizontal) destes agentes. Na espécie canina só existe um trabalho relatando a presença do *T. gondii* no sêmen de cães experimentalmente infectados, e a pesquisa de *N. caninum* ainda não foi realizada. A presença do *T. gondii* foi relatada no sêmen de cães experimentalmente infectados, e o *N. caninum* foi detectado no sêmen de bovinos, até o momento. O capítulo I é uma revisão bibliográfica que aborda informações sobre a neosporose e toxoplasmose com a classificação dos protozoários, ciclos de vida, vias de transmissão, o impacto na reprodução canina e métodos de diagnósticos.

Palavras-chave: neosporose, toxoplasmose, transmissão venérea.

ABSTRACT

The neosporosis is a disease caused by the protozoa *Neospora caninum* and the toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, which are obligate intracellular parasites. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* cause abortion, neonatal mortality and neurological diseases. Both protozoa are transmitted by two mechanisms: horizontal and vertical ways. There are evidences on the possible venereal transmission (horizontal) of these agents. There is only one study reporting the presence of *T. gondii* in semen of experimentally infected dogs, and detection of *N. caninum* has not been realized. The presence of *T. gondii* was reported in the semen of experimentally infected dogs and *N. caninum* was detected in bovine semen, yet. The chapter I is a literature review that brings information about the neosporosis and toxoplasmosis with the classification of protozoa, their life cycles, transmission routes, impact on canine reproduction, and diagnostics.

Keywords: neosporosis, toxoplasmosis, venereal transmission.

1 Neosporose

1.1 Introdução

Em 1988 a infecção por *Neospora caninum* foi diagnosticada em cães por DUBEY *et al.*, (1988a) e o protozoário foi isolado em cultivo celular, camundongos e em cães inoculados com tecidos dos cães infectados. Os canídeos são os hospedeiros definitivos do *N. caninum*. As vias de transmissão são: a ingestão oral de tecidos com cistos (contendo bradizoítas), ingestão de oocistos e a infecção transplacentária (taquizoítas). Outras fontes de transmissão, como: venérea e via colostro ou leite também pode ser possível, mas até agora não foi comprovado. Os estudos com a transmissão venérea de *Neospora caninum* iniciaram em 2003, na Espanha. O DNA de *N. caninum* foi encontrado no sêmen de touros naturalmente infectados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e em ovinos experimentalmente infectados (SYED-HUSSAIN *et al.*, 2013). Até a presente data, a transmissão venérea de *N. caninum* através do sêmen de cães naturalmente infectados não foi estudada.

1.2 Classificação do parasito

O protozoário do gênero *Neospora* pertence ao phylum Apicomplexa, classe Sporozoea, ordem Eucoccidiida e família Sarcocystidae (DUBEY *et al.*, 1988; HOLMDAHL *et al.*, 1994). No gênero *Neospora* duas espécies são conhecidas: *Neospora caninum* (DUBEY, 1988) e *Neospora hughesi* (MARSH *et al.*, 1998).

1.3 Ciclo e hospedeiros

Neospora caninum é morfologicamente similar a outros protozoários do grupo Apicomplexa que provocam doenças sistêmicas em muitos animais como: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia heydorni*, *Isospora* sp., *Sarcocystis neurona* e *Sarcocystis canis* (DUBEY *et al.*, 2002a).

No ciclo biológico de *N. caninum* (Figura 1) são identificadas três formas parasitárias, as fases infectantes do parasito: os taquizoítas, os cistos teciduais com bradizoítas e os oocistos (DUBEY *et al.*, 1988; McALLISTER *et al.*, 1998). As formas identificadas do ciclo de vida de *Neospora hughesi* são os taquizoítas e os cistos teciduais com bradizoítas (MARSH *et al.*, 1996; DUBEY *et al.*, 2001). Os taquizoítas e os bradizoítas são estágios intracelulares encontrados nos hospedeiros intermediários e definitivos; os oocistos se desenvolvem nos hospedeiros definitivos e são eliminados nas fezes destes animais (DUBEY, 2003).

A ingestão oral de cistos com bradizoítas por hospedeiros carnívoros promove a diferenciação sexual do parasito na mucosa intestinal, com a formação de oocistos não esporulados que são excretados nas fezes (DUBEY *et al.*, 2002a). Esses oocistos esporulam no ambiente entre 24 a 72 horas, dependendo de condições de umidade, temperatura e oxigenação. Os cães eliminam os oocistos no quinto dia pós-ingestão de tecidos de animais experimentalmente ou naturalmente infectados. O número de oocistos eliminados, o período pré-patente e a duração da eliminação variam (GONDIM *et al.*, 2002). Quando os oocistos são ingeridos pelo hospedeiro intermediário, os esporozoítas infectantes são liberados no trato intestinal, penetram nas células e se transformam em taquizoítas, que se dividem rapidamente destruindo as células e disseminando a infecção (LINDSAY *et al.*, 1999b).

Os hospedeiros definitivos do *N. caninum* são os cães domésticos (McALLISTER, 1998), e alguns canídeos selvagens, como coiotes (GONDIM *et al.*, 2004) e, mais recentemente, dingos (KING *et al.*, 2010) e lobos-cinzentos (DUBEY *et al.*, 2011a). Os hospedeiros intermediários naturais são os cães,

bovinos, ovinos, caprinos, equinos, búfalos, galinhas, cervos, ratos silvestres (*Rattus norvegicus*), raposas (*Vulpes vulpes*) (DUBEY e LINDSAY, 1996; ALMERIA *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004; FURUTA *et al.*, 2007). Estima-se que exista uma diversidade de hospedeiros muito maiores (DUBEY e SCHARES, 2011). O hospedeiro definitivo do *N. hughesi* ainda não foi identificado (HOANE *et al.*, 2006).

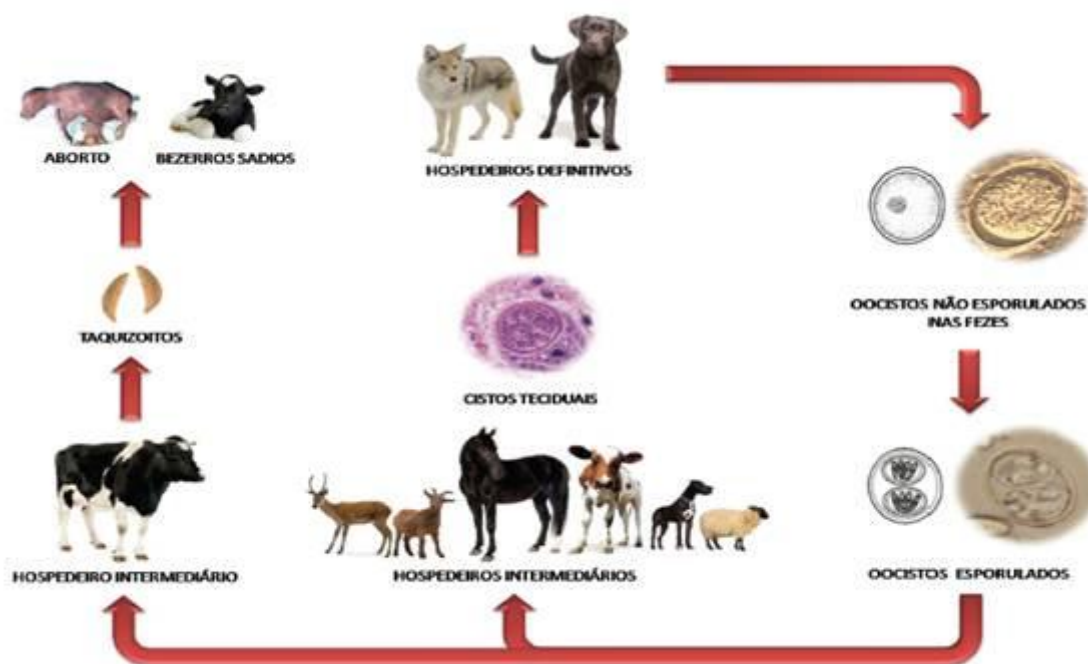


Figura 1 – Ciclo de vida e transmissão do *Neospora caninum* através da eliminação de oocistos por fezes de cães, coiotes e dingos, e a ingestão dos oocistos esporulados pelos hospedeiros intermediários. Os hospedeiros se contaminam pela ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos. A transmissão congênita ocorre com a forma de taquizoítos (esquerda). Fonte: CARDOSO (2010).

Existe também a possibilidade de transmissão do parasito entre espécies domésticas e selvagens. A importância dos animais silvestres no ciclo da neosporose, no entanto, ainda não está bem esclarecida (GONDIM *et al.*, 2004; GONDIM, 2006). A infecção de *N. caninum* em roedores selvagens é de considerável importância epidemiológica, pois roedores são animais cosmopolitas, presentes no ambiente urbano, rural e selvagem, são presas

naturais de canídeos e podem ser hospedeiros intermediários em potencial (GONDIM, 2006).

1.4 Vias de transmissão

A transmissão do *N. caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical. A transmissão horizontal é quando os hospedeiros susceptíveis ingerem através da água e alimentos contaminados oocistos esporulados ou através da ingestão de tecidos com cistos contendo bradizoítas. A transmissão vertical, infecção congênita ou infecção via placentária ocorre quando a mãe transmite a doença para seus descendentes, geração após geração (DUBEY *et al.*, 2007).

A transmissão vertical pela via lactogênica em bezerros foi demonstrada experimentalmente (UGGLA *et al.*, 1998) e a presença de DNA de *N. caninum* também foi detectado no colostro de vacas infectadas (MOSKWA *et al.*, 2007), indicando a possibilidade de transmissão de *N. caninum* pelo colostro.

A transmissão de *N. caninum* através do sêmen tem sido mais estudada nos bovinos. Algumas pesquisas no sêmen de bovinos naturalmente infectados (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e ovinos experimentalmente infectados foram realizadas (SYED-HUSSAIN *et al.*, 2013), indicando a presença de DNA do protozoário nas amostras.

Na Espanha, ORTEGA-MORA *et al.* (2003) avaliaram a transmissão venérea do *N. caninum* em bovinos naturalmente infectados, classificando-a como via de transmissão horizontal. No estudo foi utilizada a Nested-PCR para detecção do DNA de *N. caninum* no sêmen fresco e em amostras de palhetas. Os autores verificaram pelo menos uma amostra de sêmen positiva, de cinco touros naturalmente infectados, com maior incidência da presença de DNA nas amostras de sêmen fresco. Os três touros soronegativos ao parasito não apresentaram DNA de *N. caninum* no sêmen. O número de parasitos

encontrado através da PCR-real time variou entre 1 e 2,8 parasitos/ml no sêmen fresco.

A detecção do DNA de *N. caninum* foi esporádica nas amostras de sêmen de palhetas de touros naturalmente infectados, pertencentes a uma central de inseminação. Dez amostras de sêmen de cada touro obtidas em diferentes períodos foram selecionadas para o teste e 40% dos touros soropositivos apresentaram pelo menos uma amostra positiva para *N. caninum*, e o parasito foi detectado somente na fração celular da amostra, através da PCR-real time. Os bovinos soronegativos não demonstraram DNA do parasito no sêmen (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004).

FERRE *et al.* (2005) na Espanha estudaram a presença de DNA de *N. caninum* no sêmen e sangue de touros de uma central de inseminação, naturalmente infectados, e observaram a presença de DNA no sangue e/ou sêmen em seis de oito touros analisados no período de vinte e duas semanas. Porém, não conseguiu detectar a presença do *N. caninum* nos camundongos inoculados com sêmen contaminado e não encontrou associação significativa nos touros da presença de DNA de *N. caninum* no sêmen, sangue, ou ambos, e IgG específica, IgG1, IgG2, IgM e IgA ou IFN- γ . Foi o primeiro estudo que relatou a presença de DNA de *N. caninum* no sangue e sêmen de touros naturalmente infectados.

No Brasil, a primeira pesquisa de *N. caninum* no sêmen foi realizada por PITUCO *et al.* (2005), que pesquisaram 1.124 partidas de sêmen de touros de uma central de inseminação, naturalmente infectados, por meio da técnica de PCR convencional e não obteve amostras positivas. Na técnica hemi-nested PCR encontrou uma amostra positiva entre 55.

STAUBLI *et al.* (2006) na Suíça, pesquisaram através da técnica de nested-PCR a presença de DNA de *N. caninum* em cinco amostras de sêmen de 20 touros naturalmente infectados utilizados para inseminação artificial e nenhum sêmen apresentou DNA do parasito.

SERRANO *et al.* (2006) na Espanha, demonstraram que novilhas inseminadas com sêmen contaminado com 10^7 taquizoítas de *N. caninum*

apresentaram soroconversão e o parasito foi detectado no sangue e em alguns órgãos (cérebro, fígado, pulmão, útero) através da nested-PCR. A taxa de prenhez do grupo infectado foi inferior (11,1%) ao grupo controle (66,6%), indicando que a transmissão horizontal através do sêmen é possível.

CANADA *et al.* (2006) inseminaram quatro vacas com sêmen contaminado experimentalmente com *N. caninum* e somente uma delas soroconverteu com titulação de anticorpos baixa. O estudo indicou que existe uma estimulação do sistema imunológico e não uma infecção, sugerindo que a transmissão do neospora por inseminação artificial com sêmen descongelado é improvável. Mas em 2007, SERRANO-MARTÍNEZ *et al.* estudaram o potencial do sêmen contaminado *in vitro* com quantidades diferentes de taquizoítas de *N. caninum* em vários grupos de vacas, indicando que a infecção intra-uterina por sêmen contaminado causou respostas de anticorpos específicos em algumas novilhas, e *N. caninum* seria uma provável causa de morte fetal precoce em novilhas inoculadas.

SHARIFZADEH *et al.* (2012) avaliaram a presença de DNA de *N. caninum* em amostras de sêmen fresco e congelado de touros iranianos que foram usados para inseminação artificial, utilizando a PCR. Os resultados mostraram que 30 de 175 (17,14%) amostras de sêmen de touros foram infectados com *N. caninum* e o DNA do protozoário foi detectado em 17 (9,71 %) e 13 (7,43 %) amostras de sêmen fresco e congelado, respectivamente.

SYED-HUSSAIN *et al.* (2013) avaliaram experimentalmente a transmissão de *N. caninum* em ovinos da Nova Zelândia inoculando taquizoítas em carneiros mestiços e avaliando o cruzamento destes com as fêmeas. Todos os cordeiros soroconverteram após um mês da inoculação, o DNA de *N. caninum* foi detectado de forma intermitente no sêmen dos carneiros até cinco semanas após a inoculação com concentrações que variaram de 1 a 889 taquizoítas/ml. As fêmeas não apresentaram soroconversão, sugerindo que apesar do *N. caninum* ser encontrado no sêmen dos carneiros infectados experimentalmente, a transmissão por meio monta natural é um evento improvável.

ABREU (2013) pesquisou a presença de *N. caninum* no sêmen de equinos utilizando o isolamento *in vitro* e PCR convencional, mas não encontrou DNA do parasito. Em 2014, ABREU *et al.* obtiveram boa correlação da presença de anticorpo contra *N. caninum* no soro de equinos com problemas reprodutivos e cães da mesma propriedade.

Até a presente data, a transmissão venérea pode ser possível, como evidenciado em novilhas infectadas experimentalmente por inoculação intra-uterina de sêmen contaminado com taquizoítos (SERRANO *et al.*, 2006; SERRANO-MARTINEZ, 2007), mas CANADA *et al.* (2006) demonstraram que vacas inseminadas com sêmen congelado e descongelado contaminados com taquizoítos de *N. caninum* não foram infectadas. Embora o DNA de *N. caninum* seja encontrado no sêmen de touros naturalmente expostos (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005), os resultados sugerem que os protozoário presentes são poucos e raros.

1.5 Impacto na reprodução canina

Os anticorpos contra *N. caninum* foram relatados em 10% de 500 cães e 25% de 611 cães errantes do Brasil (GENNARI *et al.*, 2002), em 21,6% de 134 cães de fazendas de gado no Paraná, Brasil (SOUZA *et al.*, 2002) e em 32 (25%) dos 129 cães da área rural no Paraná, Brasil (LOCATELLI-DITTRICH *et al.*, 2008).

BARBER e TREES (1998) relataram o estudo soroepidemiológico de infecções por *N. caninum* em cães reprodutores no Reino Unido, 50 de 373 cadelas (13,4%) teve um título de RIFI > 1:50. Inicialmente, cerca de 50% de filhotes nascidos eram soropositivos e cerca de 25% dos filhotes nascidos de mães soropositivas desenvolveram a neosporose. Três cadelas produziram ninhadas sucessivas de filhotes infectados. Na criação subsequente apenas três de 118 filhotes de fêmeas soronegativas eram soropositivos.

A infecção por *Neospora caninum* é associada a distúrbios de ordem neurológica em cães, além de constituir-se em importante causa de aborto em bovinos (BERTOCCO, 2008).

Os casos mais graves de neosporose ocorrem em filhotes jovens, congenitamente infectados. Cães jovens desenvolvem paralisia dos membros posteriores, que se desenvolve em uma paralisia progressiva. Sinais neurológicos são dependentes dos locais parasitados. Os membros posteriores são mais afetados do que os membros anteriores e muitas vezes tem hiperextensão rígida. Outras disfunções que ocorrem incluem dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e até mesmo insuficiência cardíaca, e cães com paralisia dos membros posteriores podem ser alerta e sobreviver por meses (DUBEY, 2003).

A doença pode ser localizada ou generalizada e praticamente todos os órgãos podem estar envolvidos, incluindo a pele. Casos de dermatite podem ser graves envolvendo um enorme número de *N. caninum*. Cães de qualquer idade podem ser afetados. Neosporose fatal foi avaliada em oito de cães de 15 anos de idade (DUBEY, 2003). A transmissão congênita é uma das formas mais importantes de infecção. Cadelas infectadas subcl clinicamente podem transmitir o parasito para os seus fetos e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas. Não há relatos de predisposição racial ou de sexo para a neosporose canina (DUBEY e LINDSAY, 1996).

A infecção é mais comum em áreas rurais. Isso se deve ao fato de animais, nessas áreas terem maior facilidade de contato com carne e vísceras infectadas, enquanto os cães domiciliados, criados em área urbana, atualmente são alimentados principalmente com rações comerciais. Entretanto a frequência de infecção em cães é variável (BERTOCCO, 2008)

As recomendações para a profilaxia e o controle da infecção por *N. caninum* tem sido direcionadas no sentido de evitar colocar em reprodução cadelas soropositivas que já tenham apresentado sintomatologia compatível ou mesmo que tenham produzido filhotes infectados e doentes (BERTOCCO, 2008).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da neosporose pode ser realizado por métodos parasitológicos ou sorológicos (SILVA, 2005). A confirmação laboratorial de neosporose deve ser realizada preferencialmente pelo diagnóstico parasitológico com a detecção do parasito nos tecidos, por exames histopatológicos, imunohistoquímico e PCR, ou isolar os parasitos mediante a inoculação do material suspeito em cultivo celular ou em animais de laboratório (PETERS *et al.*, 2001).

Os testes sorológicos mais utilizados são RIFI (reação de imunofluorescência indireta) e ELISA (ensaio imunoenzimático), também podem ser utilizados soroaglutinação e Western Blot (HEMPHILL *et al.*, 1999). O diagnóstico sorológico de imunofluorescência indireta pesquisa os anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos taquizoítas de *Neospora sp.* no soro dos animais (PETERS *et al.*, 2001). A presença de anticorpos séricos para *Neospora sp.* indica a exposição ao parasito ou a um parasito estritamente relacionado passível de reação cruzada, como por exemplo o *T. gondii*, não indicando necessariamente a existência de infecção ativa (VARDELEON *et al.*, 2001).

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) permite amplificar sequências de *N. caninum* a partir de DNA presente em tecidos frescos, congelados e emblocados em parafina. Testes utilizados para este propósito incluem PCR convencional, PCR semi-quantitativo, nested PCR em tubo único ou PCR seguida por hibridização por sonda (JENKINS *et al.*, 2002). A sensibilidade e especificidade analíticas da PCR são influenciadas por alguns fatores importantes como: o DNA alvo apropriado (genômico ou ribossômico), escolha de *primers* específicos, protocolos adequados para extração de DNA, purificação e armazenamento de DNA molde, tempos e temperaturas de extensão, amplificação e anelamento, uso de reagentes e equipamentos apropriados. Entretanto, apesar da sensibilidade analítica da PCR, a presença do DNA do agente não é suficiente para determinar a neosporose no animal, pois a maioria das infecções ocorre sem a manifestação clínica, sendo

necessário associar as lesões histopatológicas características nos tecidos com a presença do parasito (DUBEY e SCHARES, 2006).

Os genes alvos mais utilizados na técnica da PCR para *N. caninum* são as sequências de rDNA (18S rDNA, 28S rDNA, ITS1) e o gene pNc5. Os iniciadores para as sequências do gene pNc5 são o Np6 e Np21 (YAMAGE *et al.*, 1996). Vários protocolos de PCR têm sido desenvolvidos nos últimos anos, visando detectar a região ITS1 do parasito e a sequência Nc5 específica de *Neospora*, com diferentes modificações, como nested ou hemi-nested PCR, na intenção de aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica, com diferentes resultados obtidos (COLLANTES-FERNÁNDEZ *et al.*, 2002).

Os estudos moleculares de *N. hughesi* demonstraram que não existem diferenças entre as sequências do gene da pequena subunidade ribossomal do RNA, de *N. hughesi* e *N. caninum*. A comparação das regiões ITS1 do DNA dos parasitos revelou diferenças entre a sequência dos nucleotídeos de *N. hughesi* e de *N. caninum*. A sequência da região ITS1 do DNA do *N. hughesi* é 98% similar à sequência de *N. caninum* (MARSH *et al.*, 1998).

A similaridade genômica entre as espécies apicomplexa (*N. caninum*, *Toxoplasma gondii* e *Hammondia heydorni*) tem incentivado a pesquisa e o desenvolvimento de PCR específico por espécie. Esta caracterização molecular vem sendo realizada com o sequenciamento dos ITS1 do DNA, permitindo discriminar a variabilidade inter e intraespécie. O uso da região ITS1 do DNA garante a especificidade do teste na detecção de *N. caninum*, tendo sido confirmada pela análise do BLAST que os primers da região ITS1 empregados na nested PCR são específicos para este parasito, ou seja, não ocorre reação cruzada com outros coccídeos (BARRAT *et al.*, 2008).

2 Toxoplasmose

2.1 Introdução

O primeiro relato de toxoplasmose canina foi realizado por MELLO (1910) na Itália, descrevendo a infecção aguda em cão. *Toxoplasma gondii* causa doença parasitária em mamíferos, aves e répteis, afetando principalmente o sistema nervoso central e ocasionalmente, o sistema reprodutivo, músculo e órgãos viscerais. Os felídeos são os hospedeiros definitivos. O *T. gondii* tem distribuição mundial, sendo considerado o mais cosmopolita de todos os parasitos causadores de zoonoses. As vias de transmissão incluem infecção congênita, ingestão de tecidos com cistos e ingestão oral de oocistos (SILVA *et al.*, 2006).

No ciclo de vida do *T. gondii*, após a infecção e proliferação dos taquizoítos durante o estágio agudo, o parasito localiza-se em diferentes tecidos, incluindo os órgãos reprodutores masculinos e femininos de hospedeiros intermediários. Assim, a infecção pode causar alguns efeitos adversos sobre a função reprodutiva (DALIMI e ABDOLI, 2013).

A transmissão venérea do *Toxoplasma gondii* vem sendo estudada desde 1971, iniciada com o trabalho de DISKO *et al.* que isolaram o agente em amostras seminais de homens soropositivos com infecção toxoplasmática natural.

Estudos recentes em humanos revelaram que a infecção por *T. gondii* afeta a reprodução feminina e causa infertilidade temporária masculina. Em estudos clínicos, foi relatada alta prevalência de toxoplasmose em homens estéreis. Em animais, a toxoplasmose está associada com insuficiência reprodutiva no macho. Além disso, existem algumas evidências sobre a transmissão venérea do *T. gondii* (DALIMI e ABDOLI, 2013).

2.2 Classificação do parasito

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1908) pertencente ao reino Protista, filo Apicomplexa, classe Sporozoa, ordem Eucoccidiida, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (LEVINE *et al.*, 1980).

2.3 Ciclo e hospedeiros

Nos hospedeiros definitivos ocorre o ciclo enteroepitelial ou sexual do parasito com esquizogonia e gametogonia, ocorrendo a fecundação e produção dos oocistos. Estes são eliminados com as fezes e após sofrerem esporulação no ambiente (Figura 2), produzem dois esporocistos, cada qual contendo quatro esporozoítos, tornando-se infectantes e altamente resistentes (DUBEY *et al.*, 1997; SIBLEY, 2003). Podem ser transportados mecanicamente por moscas, baratas, besouros e outros artrópodes, sendo, portanto uma forma de resistência e de disseminação ambiental dessa parasitose (FREYRE, 1989). O *T. gondii* no seu ciclo evolutivo apresenta-se sob três formas principais: taquizoíto (de rápida multiplicação e ocorrem na infecção aguda), bradizoítos (localizados em cistos teciduais e presentes na infecção crônica ou assintomática) e oocistos (produto final da reprodução sexuada) (MILLER *et al.*, 1972). Os hospedeiros definitivos são os felídeos domésticos e selvagens que podem se infectar pela ingestão de qualquer uma das três formas evolutivas, sendo a ingestão de cistos com bradizoítos, por meio do carnivorismo, a via mais frequente (SWANGO *et al.*, 1989; DUBEY, 2002).

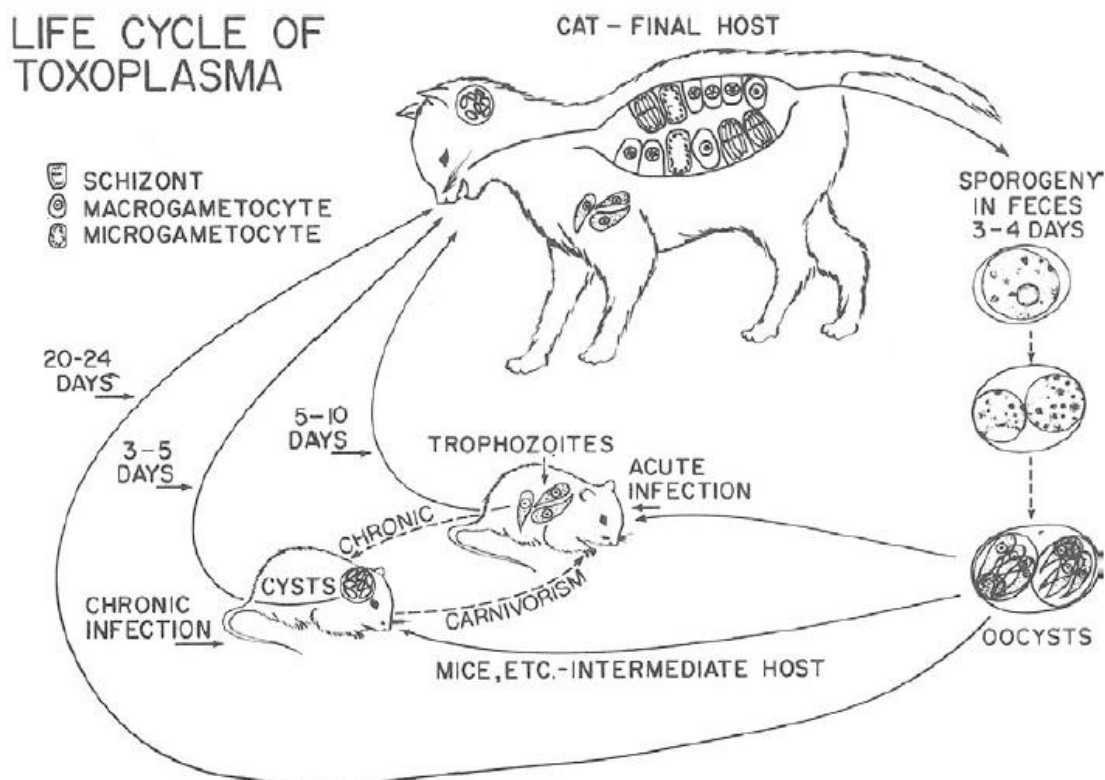


Figura 2 – Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* ocorre por transmissão de oocistos nas fezes de gatos e a ingestão dos oocistos pelos hospedeiros intermediários. Os dias indicam o tempo entre a ingestão do *Toxoplasma gondii* pelo gato até sua eliminação pelas fezes. Os ratos representam os vários hospedeiros intermediários (FRENKEL, DUBEY & MILLER, 1970).

A infecção pela via oral ocorre quando o cisto ingerido contendo a forma de bradizoíto se rompe por ação enzimática liberando as formas infectantes (esporozoítos) no trato digestivo. Os esporozoítos penetram nas células epiteliais do intestino onde, após multiplicação, transformam-se em taquizoítos. A disseminação ocorre pelo rompimento das células infectadas seguido da invasão das células vizinhas, distribuindo-se por todo organismo via circulação sanguínea ou se difundindo de uma célula a outra, podendo, ainda, ser disseminado por macrófagos, linfócitos ou granulócitos, além de circularem na corrente sanguínea na forma livre (HUTCHISON *et al.*, 1970; FRENKEL *et al.*, 1973).

Os taquizoítos disseminam-se pelo sistema vascular e atingem vários órgãos, como o sistema nervoso central (SNC), músculo esquelético, vísceras

e olhos. Nestes tecidos, os taquizoítos se multiplicam intracelularmente, e, caso a multiplicação seja intensa, causam lise celular e desencadeiam reação inflamatória local. O desenvolvimento de resposta imune protetora leva ao encistamento do parasito, formando os cistos teciduais que contêm bradizoítos, forma de multiplicação lenta, os quais podem permanecer latentes sem causar doença por vários anos. Dessa forma, encontram-se protegidos da ação do sistema imune e de drogas (DUBEY *et al.*, 1998).

2.4 Vias de transmissão

O *Toxoplasma gondii* pode ser transmitido pela via horizontal (ingestão de alimentos contaminados com oocistos ou tecidos com cistos) e vertical (infecção congênita ou placentária), como demonstra a Figura 3.

A toxoplasmose congênita constitui-se numa das formas de transmissão mais importante tanto em humanos quanto em animais domésticos, e que se manifesta com maior frequência durante os dois primeiros trimestres da gestação. Por outro lado, quando adquirida no terceiro trimestre, ocorrem infecções subclínicas no feto ou mesmo ausência de infecção (DESMONTS e COUVREUR, 1974). Em ovinos, caprinos, suínos e bovinos, a transmissão congênita de *T. gondii* pode ocasionar grandes prejuízos econômicos, decorrentes principalmente de abortos, natimortos e descendentes debilitados (VITOR e PINTO, 1991; FILHO *et al.*, 2001).

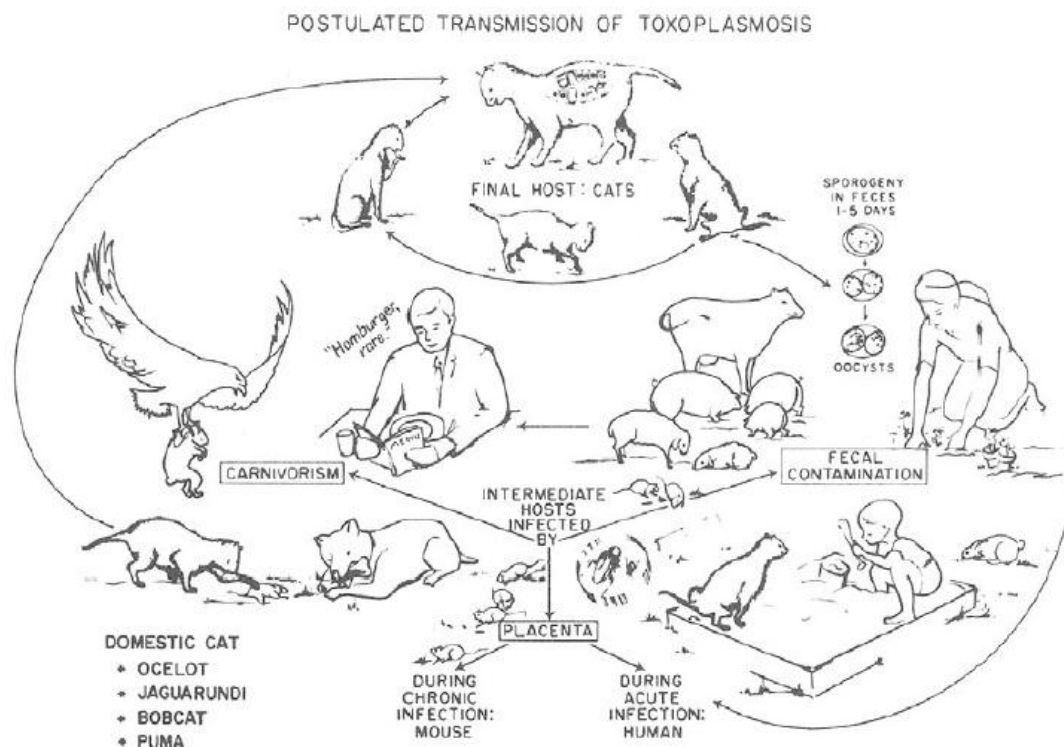


Figura 3 – Transmissão da toxoplasmose. Os oocistos são eliminados pelas fezes dos gatos e outros felídeos, após a esporulação são infecciosos para uma grande variedade de hospedeiros intermediários. Carnivorismo é uma importante forma de transmissão (esquerda). Transmissão transplacentária é demonstrada abaixo (FRENKEL, 1973a).

Também é relatada a transmissão de taquizoítos aos neonatos pela ingestão de leite (via lactogênica) logo após o nascimento (DUBEY, 1993).

Trabalhos relatam a presença de *Toxoplasma gondii* no sêmen de algumas espécies. A ocorrência de formas infectantes de *Toxoplasma gondii* foi demonstrada no sêmen de ovinos (SPENCE *et al.*, 1978, BLEWETT *et al.*, 1982, TEALE *et al.*, 1982, LOPES *et al.*, 2009, MORAES *et al.*, 2010), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980), humanos (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 1996), suínos (MOURA *et al.*, 2007), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009) e cães (ARANTES *et al.*, 2009), originando discussões sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito, porque a importância da transmissão venérea é desconhecida.

SPENCE *et al.* (1978) inocularam *T. gondii* em dois ovinos e verificaram o parasito no sêmen em 20 dias após a infecção em um dos animais, e nos dias 20 e 25 no segundo animal.

DUBEY e SHARMA (1980) isolaram *T. gondii* em camundongos a partir de amostras de sêmen de caprinos experimentalmente infectados por inoculação oral de oocistos. Estes caprinos eliminaram o parasito no sêmen por até 52 dias infecção. Em 1982, TEALE *et al.* (1982) detectaram o parasito em 50% dos carneiros machos infectados apenas em duas ocasiões, 16 e 26 dias após a infecção experimental.

Em ovinos experimentalmente infectados (LOPES *et al.*, 2009) foram observadas alterações clínicas (hipertermia e apatia), resposta ao estímulo antigênico com altos títulos de anticorpo, presença do DNA de *T. gondii* em amostras de sêmen em períodos variáveis, isolamento *in vivo* da cepa do parasito em 14 amostras de sêmen e a presença do DNA do protozoário em tecidos (testículo, epidídimo, vesícula seminal e próstata) de alguns dos animais infectados. SCARPELLI *et al.*, (2009) e MOURA *et al.*, (2007) obtiveram resultados similares com touros e suínos experimentalmente infectados, respectivamente, que demonstraram altos títulos de anticorpos, presença do DNA do parasito em várias coletas de sêmen, isolamento do protozoário inoculando sêmen em camundongos, que depois apresentaram cistos de *T. gondii* no cérebro e a presença do DNA de *T. gondii* também nos tecidos dos animais, como testículo, epidídimo e vesícula seminal.

ARANTES *et al.* (2009) infectaram experimentalmente cães com *T. gondii*, encontraram e isolaram o parasito em ejaculados esporádicos. Os autores observaram a presença do parasito através da técnica de imunohistoquímica em fragmentos do testículo e epidídimo nos seis cães. Em quatro cadelas inseminadas com amostras de sêmen contendo 1×10^6 taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*, ocorreu reabsorção embrionária em duas delas e o protozoário foi encontrado no cérebro dos quatro filhotes. Os resultados deste trabalho mostram que cães infectados com *T. gondii* podem eliminar taquizoítas viáveis no sêmen na fase aguda, que a inseminação

artificial com sêmen contaminado pode gerar problemas reprodutivos e, consequentemente, a transmissão vertical para os filhotes.

MORAES *et al.* (2010) observaram a presença de DNA de *T. gondii* em 66% das amostras de sêmen de ovinos naturalmente infectados, através da técnica de nested-PCR, e os animais com títulos mais elevados de anticorpos séricos foram os que apresentaram o DNA do parasito no sêmen.

De acordo com TERPSIDIS *et al.* (2009), a infecção toxoplásmica também pode causar alterações andrológicas e reprodutivas no macho, independentemente da espécie acometida. Estes autores ao infectarem ratos Wistar comprovaram alterações nos parâmetros reprodutivos e andrológicos, principalmente em relação à motilidade, concentração e morfologia espermática. Concordando com o trabalho de ABDOLI *et al.* (2012) que infectaram ratos machos com a cepa RH de taquizoítos de *T. gondii* e, após cada 10 dias, de 10 a 70 dias após a infecção, o percentual de peso corporal em relação ao peso dos testículos, e os parâmetros de espermatozoides do epidídimo (número, motilidade, viabilidade e taxas de morfologia), testosterona, testosterona intratesticular, lactato desidrogenase sérica e lactato desidrogenase intratesticular e frutose em vesículas seminais e glândulas de coagulação foram medidos e observaram alterações no período de observação. Os resultados do estudo mostraram taxas de motilidade espermática, viabilidade e concentração significativamente menores após a infecção, até 70 dias. As anormalidades espermáticas também foram elevadas durante o período. A toxoplasmose pode causar deficiência não permanente nos parâmetros reprodutivos de ratos machos (ABDOLI *et al.*, 2012).

Em estudos mais recentes (WANDERLEY *et al.*, 2013), a transmissão de *Toxoplasma gondii* em caprinos experimentalmente infectados foi comprovada, por via vaginal, com sêmen contaminado com a cepa CPG (genótipo III). Dez cabras foram separadas aleatoriamente em dois grupos (G1 e G2), cada um com cinco animais e inseminadas durante o estro. As cabras no G1 foram inseminadas com sêmen contendo 1×10^5 taquizoítos, e no G2 (controle) foram inseminadas com sêmen livre de taquizoítos (inseminação = dia 0). No G1, a soroconversão (reação de imunofluorescência indireta) e DNA (reação em

cadeia da polimerase) no sangue estava presente em 4/5 e 3/5, respectivamente, a partir do 7^o dia. No G2, todos os caprinos foram negativos em todos os testes. A reabsorção embrionária ocorreu em quatro de cinco cabras do G1 entre os dias 21 e 49.

A detecção de formas proliferativas de *T. gondii* no sêmen de reprodutores naturalmente infectados por meio da PCR reforça a necessidade de intensificar os estudos sobre a possibilidade da transmissão horizontal do parasito via sêmen nas diversas espécies.

2.5 Impacto na reprodução canina

A infecção por *T. gondii* em cães é muito comum e é demonstrada pelos vários estudos de prevalência sorológica, enquanto que a toxoplasmose clínica é muito pouco frequente, com maior ocorrência em animais jovens e está associada a fatores imunossupressores, infecções ou ao vírus da cinomose (DUBEY, 1985).

Os sinais clínicos da toxoplasmose em cães são caracterizados por ataxia, diarreia e doença respiratória (AHMED *et al.*, 1983). Necrose focal em áreas do pulmão, fígado e cérebro de cães infectados são comuns e podem desenvolver muitos sinais clínicos. Portanto, a toxoplasmose em cães e outros animais podem imitar muitas doenças infecciosas (DUBEY, 1985).

A prevalência deste parasito em cães é elevada. Na região do Paraná encontraram 50,89% de cães soropositivos (ZULPO *et al.*, 2012) e em Santa Catarina a prevalência foi de 22,3% (MOURA *et al.*, 2009). Devido ao elevado índice de animais naturalmente infectados por *T. gondii*, agente reconhecidamente oportunista e sua correlação com doenças imunossupressivas como a cinomose (MORETTI *et al.*, 2002), deve-se atentar para a ocorrência desta enfermidade na espécie canina.

Aspectos reprodutivos da toxoplasmose foram estudados por HELLEY (1970) que verificou que a infecção toxoplásmica em cadelas, em vários

estágios gestacionais, pode provocar mortalidade dos filhotes do 4º ao 75º dias pós-nascimento.

BRESCIANI *et al.* (1999) observaram aborto e morte fetal em cadelas experimentalmente infectadas com *T. gondii* no terço médio e final da gestação, com $1,5 \times 10^4$ oocistos por via oral ou $1,0 \times 10^7$ taquizoítos, por via subcutânea.

Posteriormente, estas alterações reprodutivas também foram observadas em fêmeas caninas naturalmente infectadas e que foram artificialmente reinfectadas aos 30 dias de prenhez com as mesmas formas evolutivas do referido protozoário em forma de inóculos de concentração idêntica à supracitada. Os filhotes originários dessas mães nasceram sorologicamente positivos, com títulos de anticorpos de 1:64 até 1:256, sendo aparentemente saudáveis, com exceção de um neonato que se mostrou debilitado. Foi possível detectar o parasito em amostras de saliva, leite e urina desses animais. Imunomarcagem positiva de cistos e/ou taquizoítos foi evidente pela técnica de imunohistoquímica, em 23 órgãos dos animais experimentais evidenciando a importância da infecção pré-natal (BRESCIANI, 2003; BRESCIANI *et al.*, 2004).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico da toxoplasmose pode ser realizado por isolamento *in vitro* e *in vivo*, sorologia, histopatologia, imunohistoquímica e PCR. Na maioria dos casos o diagnóstico sorológico é o mais utilizado, com duas técnicas: de aglutinação direta modificada (MAD) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (CAMOSSO *et al.*, 2010). Independente do método é importante o emprego de amostras coletadas com intervalos de duas semanas para determinar a soroconversão, indicativo de infecção recente (HILL e DUBEY, 2002). O teste de imunoadsorção enzimática (ELISA), permite a detecção de resposta de IgM compatível com infecção ativa recente. A resposta de IgG é geralmente alta e pode persistir por vários dias e indica uma exposição

anterior, ou seja, indicativo de casos crônicos. Nos casos fatais, o exame histopatológico e imunohistoquímico revela os taquizoítos e os cistos teciduais nos órgãos afetados (SILVA *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, o diagnóstico molecular da toxoplasmose em humanos e animais tem sido utilizado, acelerando o diagnóstico pelo menor tempo e maior precisão. Diferentes técnicas de PCR podem ser utilizadas, entre as quais, a *nested*-PCR e a *real-time* PCR, que mostram boa especificidade e sensibilidade (FUENTES *et al.*, 1996; MONTOYA *et al.*, 2009; MONTOYA *et al.*, 2010). O desenvolvimento do *real-time* PCR minimiza o tempo necessário para detectar o DNA de *T. gondii*, além de realizar a quantificação do parasito e reduzir os problemas de contaminação (COSTA *et al.*, 2000;. LIN *et al.*, 2000).

REFERÊNCIAS

ABDOLI, A.; DALIMI, A.; MOVAHEDIN, M. Impaired reproductive function of male rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Andrologia**, v. 44, Suppl 1:679-87, 2012.

ABREU, R. A. Diagnóstico sorológico de *Neospora sp.* e *Toxoplasma gondii* e sua investigação no sêmen de garanhões em propriedades com falhas reprodutivas. **Dissertação de Mestrado do Curso de Pós Graduação de Engenharia em Bioprocessos e Biotecnologia UFPR**, p. 114-145, 2013.

ABREU, R. A.; WEISS, R.R.; SOCCOL-THOMAZ, V.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; LASKOSKI, L. M.; BERTOL, M.A.F.; KOCH, M.O.; ALBAN, S.M.; GREEN, K.T. Association of antibodies against *Neospora caninum* in mares with reproductive problems and presence of seropositive dogs as a risk factor. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 128-131, 2014.

AHMED, B.A.; GAAFAR, S.M.; WEIRICH, W.E.; KANITZ, C.L. Relationship of *Toxoplasma* infections to other diseases in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 12, p. 199 – 203, 1983.

ALMERÍA, S.; FERRER, D.; PABLÓN, M.; CASTELLÀ, J.; MAÑAS, S. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v.107, p. 287-294, 2002.

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 190–194, 2009.

BARBER, J.S.; TREES, A.J.; Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. **International Journal of Parasitology**, v. 28, p. 57-64, 1998.

BARRATT, J.; QASSAB, A. S.; REICHEL, P. M.; ELLIS, T. J. The development and evaluation of a nested PCR assay for detection of *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* in feral mouse tissues. **Molecular and Cellular Probes**, v. 22, n. 4, p. 228-233, 2008.

BERTOCCO, B.P. Infecção por *Neospora caninum* em cães e outros carnívoros. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VI, n. 10, 2008.

BLEWETT, D.A.; TEALE, A.J.; MILLER, J.K.; SCOTT, G.R.; BUXTON, D. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. **Veterinary Record**, v. 24, p. 73–77, 1982.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; TONIOLO, G. H.; SABATINI, G. A.; MORAES, F. R.; PAULILLO, A. C.; FERRAUDO, A. S. Experimental toxoplasmosis in pregnant bitches. **Veterinary Parasitology**, v.86, n. 2, p.143-145, 1999.

BRESCIANI, K. D. S. Estudo da reinfecção por *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 1909) em cadelas gestantes naturalmente infectadas. **Tese de Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva** – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p. 132, 2003.

BRESCIANI, K. D. S.; COSTA, A. J.; TONIOLO, G. H.; KANAMURA, C. T.; LUVIZZOTO, M. C. R.; MORAIS, F. R.; PERRI, S. H. V. Transmissão transplacentária de *Toxoplasma gondii* em cadelas gestantes reinfetadas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 1, p. 214, 2004.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; FERNANDEZ, E.C.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329–1336, 2004.

CAMOSSI, L.G.; SILVA, A.V.; LANGONI, H. Inquérito sorológico para toxoplasmose em equinos na região de Botucatu-SP. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.2, p.484-488, 2010.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; FERREIRA, P.; COSTA, J.M.C.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semen *in vitro* contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 139, p. 109-114, 2006.

CARDOSO, J. M. S.; Aspectos epidemiológicos da infecção por *Neospora caninum* em bovinos leiteiros da região do Vale do Paraíba Paulista. **Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 136 f., São Paulo, 2010.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGAMORA, L. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

COSTA, J.M.; PAUTAS, C.; ERNAULT, P.; FOULET, F.; CORDONNIER, C.; BREATAGNE, S. Real time PCR for diagnosis and follow-up of *Toxoplasma* reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p. 2929–2932, 2000.

DALIMI, A.; ABDOLI, A. *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new Aspect of Toxoplasmosis Research. **Jundishapur Journal of Microbiology**, e7184, v. 6, n. 8, 2013.

DESMONTS ,G.; COUVREUR, J., Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. **New York Academy of Medicine**, v.50, n.2, p.146, 1974.

DISKO, R.; BRAVENY, I.; VOGEL, P. Studies on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in the human ejaculate. **Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 22, n. 4, p. 391-396, 1971.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 5, p.794–795, 1980.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis in dogs. **Canine Practice**, v. 12, p. 07-28, 1985.

DUBEY, J.P.; CARPENTER, J.L.; SPEECER, C.A.; TOPPER, M.J.; UGGLA, A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.192, n.10, p.1269-1285, 1988.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988a.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: **Parasitic Protozoa** (ed. Kreier, JP), v. 6, n. 2, p.1-158, 1993.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.67, n.1-2, p.1-59, 1996.

DUBEY, J. P.; SPEER, C. A.; SHEN, S. K.; KWOK, O.C.H.; BLIXT, J.A. Oocyst induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal of Parasitology**, v.83, n. 5, p. 870 – 882, 1997.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J.P., LIDDEL, S., MATTSON, D., SPEER, C.A., HOWE, D.K., JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **The Journal of Parasitology**, v.87, n.2, p.345-353, 2001.

DUBEY, J.P. Tachyzoite-induced life cycle of *Toxoplasma gondii* in cats. **The Journal of Parasitology**, v. 88, n. 4, p. 713-717, 2002.

DUBEY, J.P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKAS, I.; BJORKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, A.E.; MATTISSON, J.G.; McALLISTER, M.M.; MODRY, D.; OMATA, Y.; SIBLEY, L.D.; SPERR, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAMS, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 8, p.929-946, 2002a.

DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 41, p.1-16, 2003.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 1-34, 2006.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals – The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90-108, 2011.

DUBEY, J.P.; JENKINS, M.C.; RAJEDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.R.; MARTINS, J.; KWOK, O.C.H.; CHOUDHARY, S. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 382-387, 2011a.

FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, p. 1504-1518, 2005.

FILHO, J.R.E.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MYASAKA, D.; CASTAGNOLLI, K.; COSTA, A.J. Toxoplasmose experimental em coelhas gestantes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.1, p. 3-10, 2001.

FRIDLUND-PLUGGE, N.; FERREIRA, F.M.; RICHARTZ, R.R.; de SIQUEIRA, A.; DITTRICH, R.L. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 202-6, 2011.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D.M.; LONG, P.L. **The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related genera**, Baltimore: University Park Press, p. 343-410, 1973.

FRENKEL, J. K. Toxoplasma In and Around Us. **BioScience**, v. 23, n. 6, p. 343-352, 1973a.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii*: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.

FREYRE, A. Toxoplasmosis em las espécies domesticas y como zoonosis. **Departamento de Publicaciones de La Universidad de la Republica do Uruguai**, Montevideo, p.332, 1989.

FUENTES, I.; RODRIGUEZ, M.; DOMINGO, C.J.; DEL CASTILLO, F.; JUNCOSA, T.; ALVAR, J. Urine simple used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. **Journal Clinical of Microbiology**, v.34, p.2368–2371, 1996.

FURUTA, P.I.; MINEO, T.W.P.; CARRASCO, A.O.T.; GODOY, G.S.; PINTO, A.A.; MACHADO, R.Z. *Neospora caninum* infections in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. **Parasitology**, v.134, p.1931-1939, 2007.

GENNARI, S.M.; YAI, L.; DÁURIA, S.N.R. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology**, v. 106, p. 177-179, 2002.

GONDIM, L.F.P.; GAO, L.; MCALLISTER, M.M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and *in vitro* isolation from oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 6, p. 1159-1163, 2002.

GONDIM, L.F.P; McALLISTER, M.M.; PITT, W.C.; ZEMPLICKA, D.E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p.159-161, 2004.

GONDIM, L.F. *Neospora caninum* in wildlife. **Trends in Parasitology**, v.22, n.6, p.247-252, 2006.

HELLEY, D. M. Toxoplasmosis. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.10, p.627-629, 1970.

HEMPHILL, A.; FUCHS, N.; SONDA, S.; HEHL, A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.1175-1188, 1999.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HOANE, J.S.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S.; YAI, L.E.O.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G. T.; BONESI, G.L.; HOWE, D.K. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora spp.* infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. **Veterinary Parasitology**, v. 136, p. 155-159, 2006.

HOLMDAHL, O.J.M.; MATTSSON, J.G.; UGGLA, A.; JOHANSSON, K.E. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 187-192. 1994.

HUANG, C.C.; YANG, C.H.; WATANABE, Y.; LIAO, Y.K.; OOI, H.K. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). **Veterinary Research**, v. 35, p. 283-290, 2004.

HUTCHISON, W.M.; DUNACHIE, J.F.; SIIM, J.C.; WORK, K. Coccidian - like nature of *Toxoplasma gondii*. **British Medical Journal**, v.1, n. 5689, p.142-144, 1970.

JENKINS, M.; BASZLER, T.; BJORKMAN, C. SCHARES, G.; WILLIAMS, D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum* – associated bovine abortion. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 631-636, 2002.

KING, J.S.; SLAPETA, J; JENKINS, D.J.; AL-QASSAB, S.E.; ELLIS, J.T.; WINDSOR, P.A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 8, p. 945-950, 2010.

LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLICH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINPELD, E.G.; PAGE, F.C; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the Protozoa. **Journal Protozoology**, v.27, p.37-58, 1980.

LIN, M.H.; CHEN, T.C.; KUO, T.T.; TSENG, C.C.; TSENG, C.P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal Clinical of Microbiology**, v.38, p.4121–4125, 2000.

LINDSAY, D.S.; DUBEY, J.P.; McALLISTER, M.M. *Neospora caninum* and the potential for parasite transmission. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.21, n.4, p.317-321, 1999b.

LOCATELLI-DITTRICH, R; MACHADO JR, P.C.; FRIDLUND-PLUGGE, N.; RICHARTZ, R. R.T.B.; MONTIANI-FERREIRA, F.; PATRÍCIO, L.F.L.; PATRÍCIO, M.A.C.; PIEPPE, M. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 17, supl. 1, p. 191-196, 2008.

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SANTANA, L.F.; SANTOS, R.S.; ROSSANESE, W.M.; LOPES, W.C.Z.; COSTA, G.H.N.; SAKAMOTO, C.A.; SANTOS, T.R. Aspects of Toxoplasma Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis Aries*). **Journal of Parasitology Research**, article ID 602803, 2009.

MARSH, A.E., BARR, B.C., MADIGAN, J., LAKRITZ, J., NORDHAUSEN, R., CONRAD, P.A. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, p. 1907-1913, 1996.

MARSH, A.E., BARR, B.C., PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **The Journal of Parasitology**, v. 84, p. 983-991, 1998.

MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J.; MAYER, R.; SANCHEZ, S.; NISTAL, M. Protozoan infections in the male genital tract. **The Journal of Urology**, v. 156, p. 340-349, 1996.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; McGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1473-1478, 1998.

MELLO, U. Un cas de toxoplasmose du chien observe à Terin. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, Paris, v. 3, p. 359-363, 1910.

MILLER, N.L.; FRENKEL, J.K.; DUBEY, J.P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; MATEO, M.; RAMÍREZ, C.; FUENTES, I. Detection of *Toxoplasma gondii* in cats by comparing bioassay in mice and polymerase chain reaction (PCR). **Veterinary Parasitology**, v. 160, p. 159–162, 2009.

MONTOYA, A.; MIRÓ, G.; BLANCO, M.A.; FUENTES, I. Comparison of nested PCR and real-time PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in biological samples from naturally infected cats. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 212-213, 2010.

MORAES, E.P.B.X.; FARIA, E.B.; BATISTA, A.M.; FREITAS, A.C.; SILVA, J.C.R.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; MOTA, R.A. Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010.

MORETTI, L. D.; UENO, T. E.; RIBEIRO, M. R.; AGUIAR, D. M.; PAES, A. C.; PEZERICO, S. B.; SILVA, A. V. Toxoplasmose em cães co-infectados com o vírus da cinomose. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

MOSKWA, B.; PASTUSIAK, K; BIEN, J; CABAJ, W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. **Parasitology Research**, v. 100, n. 3, p. 633-636, 2007.

MOURA, A.B.; COSTA, A.J.; FILHO, J.S.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 430–434, 2007.

MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E.B.; PISETTA, G.M.; JUNIOR, A.H. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 18, n. 3, p. 52-56, 2009.

MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; PISETTA, G.M.; TEIXEIRA, E.B.; JUNIOR, A.H. Anticorpos contra *Neospora caninum* e fatores de risco em cães de Lages e Balneário Camburiú, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 262-265, 2011.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. **Académie Royale des Sciences**, p. 147-736, 1908.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J.; UGARTEGARAGALZA, C.; ADURIZ, G. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 301-308, 2003.

PEDRASSANI, D. Prevalência de títulos de anticorpos imunoglobulinas G anti-*Toxoplasma gondii* Nicole&Manceaux, 1909 em cães. **Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFPR**, p. 61-71, 2001.

PETERS, M.; LÜTKEFELS, E.; HECKEROTH, A.R.; SCHARES, G. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1144-1148, 2001.

PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; FAVA, C.D.; STEFANO, E.; SHIMOZONO, O.S.; CAMARGO, N.T.C.; GALETTI, M.C.T.; OLIVEIRA, L.H. Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. Anais - **I Fórum Brasileiro de estudos sobre Neospora Caninum**. Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, USP, 2005.

SCARPELLI, L.C.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 59–64, 2009.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 197-203, 2006.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R.A.; MARTÍNEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, p. 729-737, 2007.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G.. PCR Assay for Detection of *Neospora Caninum* in Fresh and Frozen Semen Specimens of Iranian Bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 742-749, 2012.

SIBLEY, L.D. *Toxoplasma gondii*: perfecting an intracellular life style. **Traffic**, v. 4, n. 9, p. 581 – 583, 2003.

SILVA, A. C. Diagnóstico da neosporose bovina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 29-33, 2005.

SILVA, F.W.S.; ALVES, N.D.; AMÓRA, S.S.A.; TEIXEIRA, F.H.V.; ACCIOLOY, M.P.; CARVALHO, C.G.; NÓBREGA, R.M.; FILGUEIRA, K.D.; FEIJÓ, F.M.C. Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 16, n. 2, p. 71-77, 2006.

SOUZA, S.L.P., GUIMARÃES JR., J.S., FERREIRA, F., DUBEY, J.P., GENNARI, S.M. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 408-409, 2002.

SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **Veterinary Record**, v. 102, p. 38-39, 1978.

STAUBLI, D.; ITEN, C.; KNEUBUHLER, J. SAGER, H. MULLER, N. GOTTSTEIN, B. Search for *Neospora caninum* DNA in bull semen using PCR. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v. 148, n. 9, p. 483-489, 2006.

SWANGO, L.J.; BANKEMPER, K.W.; KONG, L.I. Bacterial, rickettsial, protozoan and miscellaneous infections. In: **ETTINGER, S.J. Textbook of Veterinary Internal Medicine**, 3 ed., Philadelphia: SAUNDERS, W.B., p. 265-297, 1989.

SYED-HUSSAINA, S.S.; HOWE, L.; POMROY, W.E.; WEST, D.M.; SMITH, S.L.; WILLIAMSON, N.B. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, Issues 3-4, p. 534-542, 2013.

TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of toxoplasma. **Veterinary Record**, v. 17, p. 53-55, 1982.

TERPSIDIS, K.I.; PAPAZHARIADOU, M.G.; TAITZOGLU, I.A.; PAPAIOANNOU, N.G.; GEORGIADIS, M.P.; THEODORIDIS, I.T. *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. **Experimental Parasitology**, v. 121, p. 238-241, 2009.

UGGLA, A.; STENLUND, S.; HOLMDAHL, O.J.; JAKUBEK, E.B.; THEBO, P.; KINDAHL, H.; BJÖRKMAN, C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. **International Journal of Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 1467-1472, 1998.

VARDELEON, D.; MARSH, A.E.; THORNE, J.G.; LOCH, W.; YOUNG, R.; JOHNSON, P.J. Prevalence of *Neospora hughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2-4, p. 273-282, 2001.

VITOR, R.W.A.; PINTO, J.B. Eliminação de *Toxoplasma gondii* através de urina, saliva e leite de caprinos experimentalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 42, n. 2, p. 147-154, 1991.

WANDERLEY, F.S.; PORTO, W.J.N.; CAMARA, D.R.; CRUZ, N.L.N; FEITOSA, B.C.O.; FREIRE, R.L.; MORAES, E.O.B.X.; MOTA, R.A. Experimental Vaginal Infection of Goats with Semen Contaminated with the “CPG” Strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 610-613, 2013.

ZULPO, D.L.; LEITE, J.H.A.C.; CUNHA, I.A.L.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; JUNIOR, V.E.C.; SANTOS, H.L.E.P.L.; GARCIA, J.L. Occurrence of anti-*Leishmania spp*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dog sera from Veterinary Hospital from Universidade Estadual de Londrina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1897-1906, 2012.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primes for the detection of brain “cyst” DNA of experimentally 93 infected nude mice by the polymerase chain reaction. **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

CAPÍTULO II – Isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* do sêmen de cães naturalmente infectados

RESUMO

Os protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* foram encontrados no sêmen de touros e homens, respectivamente. Em cães a prevalência destes parasitos é elevada, causando doença neurológica. No sêmen de cães poderia ocorrer a eliminação de taquizoítos, mas não existe a comprovação até o presente. O objetivo deste estudo foi comprovar a presença e viabilidade de *N. caninum* e *T. gondii* no sêmen de cães naturalmente infectados. Realizou-se a sorologia de vinte e dois cães provenientes das regiões metropolitana e rural dos estados do Paraná e Santa Catarina. Foram selecionados onze cães (quatro cães soropositivos para *N. caninum*, cinco soropositivos para *T. gondii*, dois soropositivos para ambos e dois soronegativos) para coletas de onze amostras de sêmen. Analisou-se a presença dos protozoários por meio de análise citológica, isolamento *in vitro* em cultivo de célula Vero e reação da polimerase em cadeia. As regiões alvo utilizadas na PCR foram a região de 529 pb repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* e a região Nc5 para pesquisa de *N. caninum*, com os *primers* TOX4/TOX/5 e Np6/Np21, respectivamente. Nas análises citológicas foram detectadas estruturas sugestivas dos protozoários em todas as amostras positivas para *N. caninum* e *T. gondii*. Foram obtidos *in vitro* dois isolados de *N. caninum* e cinco isolados de *T. gondii*, que causaram efeito citopático na monocamada de células e foram confirmados pela PCR. Foi detectada a presença de DNA de *N. caninum* em quatro amostras de sêmen. O DNA de *T. gondii* não foi detectado em amostras de sêmen. Em quatro cães soropositivos foi realizado coleta de sêmen após 180 dias e nestas amostras não foi encontrado DNA dos parasitos. Conclui-se que em cães clinicamente saudáveis os protozoários *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* estão viáveis no sêmen, sugerindo a possível transmissão dos parasitos por via venérea.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias (CEUA SCA) sob o protocolo n°. 036/2013.

Palavras-chave: isolamento, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

Neospora caninum and *Toxoplasma gondii* were found in semen of bulls and men, respectively. In dogs the prevalence of these parasites is high, causing neurological disease. In the semen of dogs eliminating tachyzoites could occur, but there is no evidence until the present. The objective of this study was to confirm the presence and viability of *N. caninum* and *T. gondii* in the semen of dogs naturally infected. Serology was performed in twenty-two dogs from the metropolitan and rural regions of the States of Paraná and Santa Catarina. Eleven dogs were selected (four *N. caninum* seropositive, five *T. gondii* seropositive, two seropositive for both and two seronegative) for collections of eleven semen samples. Analyzed the presence of protozoans through cytological analysis, isolation *in vitro* on Vero cell culture and polymerase chain reaction. The target regions used in the PCR were the 529 bp region repeated 200 to 300 times the genome of *T. gondii* and Nc5 region to detect *N. caninum*, with the primers TOX4/TOX/5 and Np6/Np21 respectively. In cytological analyzes were detected structures suggestive of protozoa in all samples positive for *N. caninum* and *T. gondii*. It were obtained two strains of *N. caninum* and five strains of *T. gondii*, which caused cytopathic effect on the cell monolayer and they were confirmed by PCR. The presence of *N. caninum* DNA were detected in four semen samples. The *T. gondii* DNA was not detected in semen samples. In four seropositive dogs semen was recollected after 180 days and the DNA of these parasites was not found in these samples. We conclude that in clinically healthy dogs the protozoa *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* are viable in the semen, suggesting the possible venereal transmission of theses parasites.

This project was approved by the Ethics Committee on Animal Use, Department of Agricultural Sciences (CEUA SCA) under No protocol. 036/2013.

Keywords: isolation, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*.

1 INTRODUÇÃO

A neosporose é causada pelo *Neospora caninum* e os hospedeiros definitivos são o cão, o dingo e o coiote. O primeiro isolamento *in vitro* de *Neospora caninum* foi realizado por Dubey *et al.* em 1988, de cão jovem com sinais clínicos de paresia. A neosporose é uma doença que pode causar manifestações clínicas graves nestes animais. A infecção por *Neospora caninum* é associada a distúrbios de ordem neurológica em cães, além de constituir-se em importante causa de aborto em bovinos (BERTOCCO, 2008).

No Paraná a soroprevalência da neosporose em cães é elevada, com relatos de 18,17% na região do estado do Paraná (FRIDLUND-PLUGGE *et al.*, 2011) e em Santa Catarina a prevalência foi de 12,3% (MOURA *et al.*, 2011).

A transmissão do *Neospora caninum* ocorre por dois mecanismos: horizontal e vertical. A transmissão horizontal ocorre quando os hospedeiros susceptíveis ingerem através da água e alimentos, oocistos esporulados ou tecidos com cistos com bradizoítas. A transmissão vertical, infecção congênita ou infecção via placentária ocorre quando a mãe transmite o parasito para seus descendentes, geração após geração (DUBEY *et al.*, 2007). A transmissão congênita é uma das formas mais importantes de infecção. Cadelas infectadas subcl clinicamente podem transmitir o parasito para os seus fetos e ninhadas sucessivas podem nascer infectadas. Não existem evidências de que a neosporose seja uma importante causa de aborto em cães. Não há relatos de predisposição racial ou de sexo para a neosporose canina (DUBEY e LINDSAY, 1996). A transmissão venérea pode ocorrer em bovinos (ORTEGA-MORA *et al.*, 2003; CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; PITUCO *et al.*, 2005; SHARIFZADEH *et al.*, 2012) e ovinos (SYED-HUSSAIN *et al.*, 2013), mas não há trabalhos investigando a transmissão venérea do *N. caninum* na espécie canina.

A toxoplasmose é causada pelo *Toxoplasma gondii* e os hospedeiros definitivos são os felídeos. O *T. gondii* foi isolado em pela primeira vez por SABIN e OLITSKY (1937). A prevalência deste parasito em cães é elevada. Na

região do Paraná a soroprevalência foi de 50,89% (ZULPO *et al.*, 2012) e em Santa Catarina a prevalência foi de 22,3% (MOURA *et al.*, 2009). Devido ao elevado índice de animais naturalmente infectados por *T. gondii*, agente reconhecidamente oportunista, e sua correlação com doenças imunossupressivas como a cinomose (MORETTI *et al.*, 2002), deve-se atentar para a ocorrência desta enfermidade na espécie canina.

A transmissão do *Toxoplasma gondii* também ocorre pelos mecanismos horizontal e vertical. A transmissão venérea de *Toxoplasma gondii* foi estudada no sêmen de humanos infectados (MARTINEZ-GARCIA *et al.*, 1996), bovinos (SCARPELLI *et al.*, 2009), suínos (MOURA *et al.*, 2007), cães (ARANTES *et al.*, 2009), caprinos (DUBEY e SHARMA, 1980) e ovinos (SPENCE *et al.*, 1978, BLEWETT *et al.*, 1982, TEALE *et al.*, 1982, LOPES *et al.*, 2009, MORAES *et al.*, 2010), originando discussões sobre outras possíveis formas de transmissão do parasito, porque a importância da transmissão venérea é desconhecida.

Este é o primeiro estudo investigando a presença de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* e sua viabilidade no sêmen de cães naturalmente infectados.

Os objetivos do estudo foram:

1.1 OBJETIVO GERAL

Comprovar a presença e viabilidade de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no sêmen de cães naturalmente infectados.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- realizar análise sorológica de cães clinicamente saudáveis para selecionar animais soropositivos e soronegativos para *Neospora caninum* e/ou *Toxoplasma gondii* para a coleta de sêmen;
- realizar a pesquisa dos protozoários por análise citológica do sêmen;
- isolar *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* de amostras de sêmen em cultivo de células Vero;

- manter os protozoários em cultivo celular;
- realizar PCR nos isolados obtidos no cultivo *in vitro*;
- realizar o diagnóstico de *N. caninum* e *T. gondii* por PCR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREAS GEOGRÁFICAS E ANIMAIS

A escolha dos animais foi realizada através do diagnóstico sorológico de vinte e duas amostras de soro de cães adultos e clinicamente sadios de Curitiba, no Paraná e de Rio Negrinho, em Santa Catarina (Tabela 1). Onze sangue de cães foram utilizados no estudo (nove cães com anticorpo anti-*N. caninum* e/ou anti-*T. gondii* e dois controles soronegativos), dois são de região rural de Rio Negrinho, um de região rural e oito de região urbana de Curitiba.

Tabela 1 – Regiões geográficas para o estudo sorológico e seleção de cães para o isolamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* no sêmen.

Região geográfica	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Área (km ²)
Curitiba/PR	25°25'48" S	49°16'15" W	908	15.418
Rio Negrinho/SC	26°15'16" S	49°31'06" W	790	908

Fontes: Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e Fundação do Meio Ambiente (FATMA)

2.2 AMOSTRAS

As coletas de sangue foram realizadas com contenção física, por punção da veia jugular dos cães 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Em quatro cães (cão 1, 3, 4 e 8) foi realizado coleta após 180 dias. O sangue foi coletado em tubo sem anticoagulante. Após a coagulação foi centrifugado a 3.745 g em centrífuga Sigma® (modelo 3K30) para obtenção do soro. As amostras foram mantidas congeladas (-20°C) até a análise.

As coletas de sêmen foram realizadas nos 11 (onze) cães por estimulação manual do bulbo acessório do pênis até a ereção, sendo a ejaculação total em um funil e tubo de ensaio esterilizado. Após a coleta as

amostras de sêmen foram mantidas sob refrigeração para transporte e foram inoculadas em cultivo celular no período máximo de 12 horas. Foram obtidas onze amostras de sêmen dos cães e em quatro deles foi possível realizar a coleta após 180 dias.

As amostras de sêmen foram aliquotadas para realizar o exame citológico, isolamento *in vitro* e PCR.

2.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

2.3.1 Sorológico

O diagnóstico sorológico foi realizado em vinte e duas amostras de soro de cães pela técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para avaliar a presença de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* (Anexo A). As amostras de soro foram diluídas com PBS e o ponto de corte foi a diluição de 1:50. As amostras positivas foram tituladas.

Os soros dos cães foram avaliados em lâminas de RIFI contendo taquizoítas da cepa NC-1 de *N. caninum* e a cepa RH de *T. gondii*, produzidos *in vitro* no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

A reação de imunofluorescência indireta foi utilizada porque é considerada a metodologia de referência estabelecida para pesquisa de anticorpos de *N. caninum* e *T. gondii* (DUBEY & SCHARES, 2011; CAMARGO, 1974).

O princípio do método da RIFI é a detecção de anticorpos direcionados aos antígenos de superfície dos taquizoítas de *N. caninum* e *T. gondii*. Como estes antígenos são considerados mais específicos do que os componentes intracelulares, os taquizoítas inteiros de *N. caninum* e *T. gondii* foram fixados nos poços de lâminas de RIFI. Os anticorpos contra *N. caninum* e *T. gondii*

presentes no soro ligam-se aos taquizoítas do parasito (LOCATELLI-DITTRICH, 2002).

Na realização da RIFI com as amostras de soro dos cães, foi utilizado o conjugado anti-igG canino (SIGMA®) na diluição 1:100. A observação de uma fluorescência em todo o taquizoíta foi considerada como resultado positivo. Os soros de cães controle positivo e negativo para *N. caninum* e *T. gondii* foram incluídos em todas as lâminas, cedidos pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR. Foram considerados positivos amostras de soro na diluição 1:50.

2.3.2 Citológico

Uma gota do sêmen íntegro, de cada cão, foi utilizada para avaliação microscópica. A leitura das lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa, conforme Anexo G, foi realizada em microscópio ótico, com imersão (100X) para avaliar a presença de parasitos.

2.3.3 Isolamento *in vitro*

Este item está subdividido no processamento das amostras de sêmen para isolamento e cultivo de célula Vero.

2.3.3.1 Processamento das amostras de sêmen para isolamento

Foram processadas onze amostras de sêmen de cães para tentativa de isolamento de *N. caninum* e *T.gondii* em cultivo celular, considerando o desenvolvimento intracelular do parasito.

Após a inoculação de 200 µl de sêmen fresco íntegro em frascos de Roux de 40 ml contendo uma monocamada estabelecida de célula Vero e 5,0 ml de meio Eagle (Anexo B), os frascos de cultivo foram incubados em estufa de CO₂, na temperatura de 37°C e após três horas da inoculação a suspensão

foi removida dos frascos e o meio foi trocado. Para cada amostra foi mantido três garrafas de Vero inoculadas. O meio Eagle foi substituído duas vezes por semana. Os frascos foram examinados diariamente em microscópio invertido, para monitorar o isolamento. Na leitura dos frascos a monocamada de células era observada quanto a sua integridade, a presença de efeitos citopáticos e o aparecimento dos parasitos dentro das células ou livres no meio de cultivo. Durante cada isolamento foi mantido um frasco de Roux de 40 ml contendo célula Vero como controle negativo.

O cultivo celular foi mantido em período variável de isolamento, com mínimo de sessenta dias. Após o aparecimento dos parasitos, o cultivo foi mantido por sessenta dias para multiplicação e produção de sedimento parasitário para extração de DNA e caracterização molecular.

O critério para a realização das passagens dos parasitos para novos frascos Roux contendo tapete de célula Vero íntegro foi a infecção e destruição de aproximadamente 70% do tapete celular. O período de estabelecimento do cultivo dos isolados foi variável, compreendeu desde a primeira observação das estruturas compatíveis com protozoários até a transferência periódica para novos frascos, devido ao crescimento lento dos protozoários.

As etapas referentes ao processamento das amostras para isolamento dos parasitos, o cultivo celular e a inoculação e manipulação dos frascos de cultivo contendo os protozoários foram realizadas de maneira asséptica em fluxo laminar linear vertical.

2.3.3.2 Cultivo de células Vero

O cultivo celular foi realizado com uma linhagem de células estabelecidas, denominadas célula Vero, de rim de macaco africano e com a identificação CCL-81, no catálogo da “American Type Culture Collection” (ATCC). As células Vero apresentaram características similares às células epiteliais, como a forma poligonal e o modo de crescimento do tipo aderente formando uma camada contínua no frasco de cultivo, a monocamada ou tapete celular.

Para manutenção e isolamento de *N. caninum* e *T. gondii in vitro*, foi utilizado o cultivo das células Vero. As células foram retiradas dos botijões de nitrogênio líquido, descongeladas e inoculadas nos frascos de Roux de poliestireno. O descongelamento das células foi realizado colocando-se as ampolas em banho-maria, na temperatura de 37°C. Na suspensão de células acrescentou-se rapidamente 10 ml de meio eagle, centrifugando-se os tubos a 380 g por cinco minutos, para remoção do meio de congelamento. O sedimento de células foi suspenso em meio Eagle e inoculado nos frascos estéreis para estabelecimento da monocamada. Os frascos de cultivo foram mantidos em estufa com 5% de CO₂ e a 37°C.

As células Vero foram cultivadas em meio de crescimento Eagle (Meio Essencial Mínimo de Eagle – MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina G potássica, 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 1,25 µg/ml de anfotericina B. O meio Eagle (Anexo B) foi utilizado com pH de 7,4 (cor vermelha) para o cultivo celular, sendo ajustado com bicarbonato de sódio a 7,5%. Após o preparo, uma amostra do meio Eagle era inoculado no meio de enriquecimento para crescimento bacteriano, o caldo de cérebro-coração, “Brain Heart Infusion” – BHI por 72 horas à 37°C para detectar eventual contaminação bacteriana.

Os frascos de cultivo celular eram observados no microscópio invertido para avaliação do crescimento celular, como a adesão das células e formação da monocamada, e para avaliações das etapas do cultivo e do subcultivo.

Após o estabelecimento da monocamada realizou-se o subcultivo ou passagem, com a transferência de células de um frasco de cultivo para outros. A tripsina foi utilizada para remover as células aderentes dos frascos e as passagens foram identificadas com números sequenciais relativos ao número de vezes que o cultivo foi transferido para outro frasco.

O meio Eagle era removido dos frascos e em seguida realizava-se a lavagem da monocamada com PBS (pH 7,2). Adicionava-se uma solução de tripsina a 0,25% na quantidade suficiente para cobrir toda a monocamada. Os frascos eram observados no microscópio invertido para um controle da ação da tripsina no tapete celular e visualização da separação das células. Após a

individualização do tapete celular, removia-se a tripsina observando as células redondas em suspensão. Nesta suspensão era acrescentado meio Eagle e as células eram aspiradas suavemente e inoculadas em novos frascos, na proporção de 1:3. Na manutenção dos cultivos o meio Eagle foi substituído duas vezes por semana.

Os frascos de cultivo com monocamadas de células Vero de 24 horas foram utilizados para inocular as amostras de sêmen, porém quando não ocorria o estabelecimento da monocamada de células os frascos eram utilizados 48 horas após a passagem. As células Vero utilizadas para o isolamento e manutenção dos parasitos apresentavam números de passagens variáveis entre 190 e 210, de acordo com a disponibilidade do banco de células.

2.3.4 Caracterização Molecular de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*

A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada nas amostras de sêmen de onze cães, incluindo quatro recoletas e também nas amostras coletadas durante o isolamento (sedimento parasitário) obtidas no cultivo celular.

A caracterização molecular foi realizada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica da biologia molecular desenvolvida por Mullis (1987) (Anexo E). Os cultivos dos parasitos isolados, da cepa NC-1 de *N. caninum* e da cepa RH de *T. gondii* foram realizados *in vitro* em células Vero para obtenção do sedimento parasitário, extração de DNA e realização da PCR (Anexo C). O controle negativo da PCR foi DNA das células Vero cultivadas no laboratório e processadas para extração de DNA. A água Milli Q foi incluída como controle durante a realização da PCR para verificar possíveis contaminações por aerossóis.

A caracterização dos protozoários compreendeu o preparo dos sedimentos de parasitos, extração do DNA, técnica da PCR com eletroforese

dos produtos amplificados e visualização das bandas no transiluminador com fotografias dos géis de agarose.

As etapas da PCR foram realizadas em ambientes separados: área de extração do DNA, área de pré-PCR, área de PCR e análise por eletroforese. Na área de pré-PCR foram preparados e adicionados os componentes da solução de amplificação da PCR. A mistura dos componentes foi transportada em gelo para outra sala onde foi adicionado o DNA. Além da separação física entre as etapas da PCR foram adotadas outras medidas para evitar a contaminação dos reagentes e das amostras a serem analisadas. Outros cuidados como: armazenamento dos reagentes em alíquotas, o uso da luz ultra-violeta, a utilização de pipetas com ponteiros descartáveis e com filtros, a utilização de luvas descartáveis sem pó, uso de aventais e a abertura dos tubos de forma cuidadosa para evitar aerossóis.

2.3.4.1 Extração de DNA

Os sedimentos de parasitos obtidos de acordo com o crescimento dos isolados foram processados e armazenados em microtubos à – 20°C.

A extração de DNA dos sedimentos de cultivo e do sêmen íntegro foram realizadas com o Kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) conforme Anexo D.

Depois de realizada a extração, o DNA obtido foi mantido a – 20°C. A quantificação de DNA foi realizada no aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific®) do Departamento de Bioquímica da UFPR. As concentrações de DNA foram determinadas nas absorbâncias de 260 nm e 280 nm.

2.3.4.2 Reação da Polimerase em Cadeia – PCR

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi utilizada para a amplificação das sequências de DNA genômico dos isoladas com *primers* específicos para *N. caninum* e *T. gondii*. O princípio da técnica foi a síntese

enzimática *in vitro* das sequências de DNA produzindo várias cópias deste fragmento – os produtos de amplificação. Na realização da PCR as amostras de DNA de cada isolado foram adicionadas em uma solução de amplificação, contendo os reagentes e os *primers*, em seguida sendo incubadas no termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler® para ocorrer a síntese da sequência específica de DNA. Os produtos de amplificação foram detectados por eletroforese em gel de agarose.

Os *primers* utilizados na solução de amplificação a partir de um fragmento específico do DNA de *N. caninum* e *T. gondii* foram desenvolvidos respectivamente por Yamage M. *et al.* (1996) e Homan W.L. *et al.* (2000), descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Especificações dos *primers* utilizados na reação da polimerase em cadeia para identificação de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.

<i>Primer</i>	Sequencia (5' – 3')	Sentido	Tamanho (pb)	Posição*
Np6	CAGTCAACCTACGTCTTCT	Antisenso	328	758 – 776
Np21	GTGCGTCCAATCCTGTAAC	Senso		449 – 467
TOX4	CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG	Senso	529	Repetido 200 a 300 vezes
TOX5	CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT	Antisenso		Repetido 200 a 300 vezes

C – citosina; T – timina; A – adenina; G – guanina. *Posição do *primer* na sequência do DNA. Fonte: Np6/Np21 de YAMAGE *et al.* (1996) e TOX4/TOX5 de HOMAN *et al.* (2000).

2.3.4.3 Solução de amplificação da PCR

As amostras de sêmen íntegro, o DNA dos sedimentos parasitários, o DNA das células Vero, DNA da cepa de *N. caninum* de referência (NC-1) e DNA da cepa RH de *T. gondii* foram submetidos à amplificação utilizando-se duas combinações de *primers*: Np6 e Np21, TOX4 e TOX5. O alvo da PCR

foram as sequências Nc5 do genoma do *N. caninum* e a região não-codificante de 529 pb repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii*.

Na PCR foi utilizada uma solução de amplificação contendo água Mili Q, um tampão, dois *primers* específicos, uma mistura de nucleotídeos, dNTPs, íons de magnésio, enzima Taq polimerase e o DNA previamente extraído

Os componentes da reação de amplificação do DNA de *N. caninum* com as respectivas concentrações utilizadas em uma reação de PCR encontram-se na Tabela 3 e os componentes da reação de amplificação do DNA de *T. gondii* encontram-se na Tabela 4. O programa e a técnica de PCR encontram-se no Anexo E.

As soluções de amplificação da PCR foram preparadas em fluxo laminar na área de pré-PCR. Antes do preparo da solução de amplificação o fluxo laminar foi previamente higienizado com hipoclorito de sódio e a lâmpada UV foi mantida ligada por 15 minutos. A solução de amplificação contendo a mistura dos componentes foi distribuída em alíquotas nos tubos de PCR, sendo transportados em gelo para a sala onde foi adicionado o DNA. A solução foi homogeneizada rapidamente em vórtex e centrifugada.

Tabela 3 – Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Neospora caninum* e respectivas concentrações na reação com os *primers* Np6/Np21.

Componentes	Concentração da solução de uso	Volume na reação (µl)	Concentração final
Água Mili-Q	----	18,4	qsp
Tampão	10X	2,5	1X
Primer Np6	25 mM	0,5	0,5 pmol
Primer Np21	25 mM	0,5	0,5 pmol
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
DNTPs	25 mM	0,2	0,2 mM
Taq polimerase	50 mM	0,2	1 U/µl
DNA	----	1,5	60 ng
Total	----	25,0	----

Tabela 4 – Componentes da reação da polimerase em cadeia para amplificação do DNA de *Toxoplasma gondii* e respectivas concentrações na reação com os *primers* TOX4/TOX5.

Componentes	Concentração da solução de uso	Volume na reação (µl)	Concentração final
Água Mili-Q	----	18,4	qsp
Tampão	10X	2,5	1X
Primer TOX4	25 mM	0,5	0,5 pmol
Primer TOX5	25 mM	0,5	0,5 pmol
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
DNTPs	25 mM	0,2	0,2 mM
Taq polimerase	50 mM	0,2	1 U/µl
DNA	----	1,5	60 ng
Total	----	25,0	----

Os reagentes utilizados no preparo das soluções de amplificação da PCR e reconstituição dos *primers* estão descritos no Anexo H.

2.3.4.4 Amplificação do DNA

Na reação de amplificação das amostras com os *primers* Np6 e Np21 o termociclador (Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler®) foi programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 35 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 54°C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 74°C para extensão do DNA a partir dos *primers*, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

Para a amplificação das amostras com os *primers* TOX4 e TOX5, o termociclador foi programado para realizar uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 32 ciclos de 35 segundos a 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos a 65°C para anelamento dos *primers* ao DNA, 30 segundos a 74°C para extensão do DNA a partir dos *primers*, pela Taq polimerase. No final foi programado 1 ciclo de 5 minutos a 72°C para a extensão final e posterior manutenção a 4°C até a retirada das amostras.

2.3.5 Identificação dos produtos da PCR

Após o processo de amplificação os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, utilizando fonte Thermo Scientific® a 95 volts (Anexo F). Na eletroforese foi utilizado o marcador 1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen® 250µg (1,0µg/µl), um padrão contendo fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos, de 100 a 10.000 pares de bases. A eletroforese dos produtos da PCR forneceu o resultado da amplificação e a sua especificidade conforme a presença dos fragmentos de DNA corados com safer® de tamanho esperado sob a forma de bandas. Os géis foram observados no transiluminador de ultravioleta (Loccus biotecnologia® LTB-20X20ST) e fotografados com máquina SONY® Cyber-shot DSC-W200.

2.3.6 PCR da região ITS1

Para a região ITS1, foi realizada a PCR com os *primers* ITS5 5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3' e ITS2 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC3' (WHITE *et al.*, 1990). Os diferentes organismos pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae possuem sequências de nucleotídeos diferentes na região codificadora do ITS1, de forma que a análise deste locus permite distinguir estes organismos. Os componentes da solução de amplificação utilizada para a região ITS1 foram os mesmos das reações utilizando os *primers* Np6/Np21 e TOX4/TOX5. A reação de amplificação com os *primers* ITS5/ITS2 foi realizada no termociclador Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler® programado conforme descrito no Anexo E.

Para o sequenciamento foi realizado a PCR de quatro amostras (isolados de sêmen do cão 2, 5, 6 e 7) com os *primers* ITS5/ITS2 para obter a região ITS ("internal transcribed spacer") que está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS & DIXON, 1991). A análise da sequência de nucleotídeos da região ITS1 constitui uma importante ferramenta para definição de isolados de um determinado organismo e diferenciação entre parasitos estreitamente relacionados (MARSH *et al.*, 1998; DUBEY *et al.*, 2001; GONDIM *et al.*, 2004).

2.3.7 Produtos amplificados obtidos da região ITS1 submetidos ao sequenciamento para confirmar a identidade de *T. gondii* e/ou *N. caninum*

Os produtos obtidos da região ITS1 foram submetidos à purificação para remoção de dNTPs, *primers* não incorporados na reação e o DNA da amostra que não foi amplificado, através de acetato de amônio, etanol absoluto e etanol 70%. O protocolo utilizado encontra-se no Anexo I. Foi realizada eletroforese em gel de agarose após a purificação dos produtos amplificados para confirmar a existência de apenas um fragmento amplificado em cada amostra. Os produtos obtidos foram enviados para a empresa de sequenciamento ACTGene Ludwig Biotec, localizada em Alvorada/RS. As sequências

nucleotídicas obtidas pela amplificação e sequenciamento foram alinhadas e comparadas aos dados presentes no “GeneBank”. Para comparações das sequências obtidas foi utilizado o programa “BLAST” disponível no site da NCBI (National Center for Biotechnology Information).

2.4 Criopreservação dos protozoários

Os isolados, a cepa de referência de *N. caninum* (NC-1) e de *T. gondii* (RH) foram congeladas para conservação e manutenção nos botijões de nitrogênio líquido. As monocamadas com grupos de protozoários nas células foram removidas dos frascos de cultivo com o auxílio de uma haste de borracha. A suspensão obtida de cada frasco foi centrifugada (centrífuga Sigma® modelo 3K30) a 380 g por 10 minutos a 6°C. No sedimento contendo os protozoários foi acrescentado 2 ml de meio de congelamento, lentamente. O meio de congelamento foi preparado com 50% de meio Eagle, 40% de soro fetal bovino e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) como crioprotetor.

3 RESULTADOS

3.1 Diagnóstico Sorológico

O método da imunofluorescência indireta detectou anticorpos do tipo IgG sérico anti-*N. caninum* em três cães (13,63%), anti-*T. gondii* em quatro cães (18,18%) e anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* em dois cães (9,09%), do total de vinte e duas amostras de soro. A titulação foi realizada nos nove animais soropositivos, que variou de 1:50 a 1:400 (Tabela 5).

Tabela 5 – Titulação realizada pela técnica de imunofluorescência indireta com detecção de anticorpos do tipo IgG anti-*Neospora caninum* e/ou anti-*Toxoplasma gondii* em onze cães com quatro recoletas.

CÃES	SOROLOGIA	TÍTULO
1	<i>T. gondii</i>	1:400
2	<i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	1:100 e 1:50
3	<i>N. caninum</i>	1:50
4	<i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>	1:50 e 1:50
5	<i>T. gondii</i>	1:200
6	<i>T. gondii</i>	1:200
7	<i>N. caninum</i>	1:50
8	<i>N. caninum</i>	1:50
9	<i>T. gondii</i>	1:50
10 ^a	Negativo	-
11 ^a	Negativo	-
1 ^b	<i>T. gondii</i>	1:100
3 ^b	<i>N. caninum</i>	1:50
4 ^b	Negativo	-
8 ^b	Negativo	-

^a Cães negativos para ambos os protozoários. ^b Recoletas de sangue após 180 dias.

3.2 Análise citológica do sêmen

Em todas as lâminas de sêmen positivos na PCR para *N. caninum* e/ou *T. gondii* coradas com o método de May-Grunwald-Giemsa foram observadas estruturas similares à forma dos protozoários.

3.3 Isolamento *in vitro*

Das onze amostras de sêmen inoculadas para isolamento dos parasitos foram observados protozoários em seis amostras em cultivo. Os isolamentos foram confirmados como *N. caninum* (duas amostras) e *T. gondii* (cinco amostras) na reação da polimerase em cadeia (PCR). O cão 2 apresentou dois isolados na mesma amostra (Tabela 6).

Os períodos necessários de isolamento, desde a inoculação até o início do processo de multiplicação dos protozoários com visualização de estruturas extracelulares e efeito citopático no tapete celular pela observação em microscópio invertido, estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* isolados do sêmen de cães, presença de efeito citopático no cultivo de célula Vero e seus respectivos períodos de isolamento que variaram de 10 a 90 dias.

CÃES	ISOLADOS	PERÍODO/DIAS	EFEITO CITOPÁTICO
1	NC S1 (PR)	30	Positivo
2	NC S2 (SC) e TG S1	10	Positivo
4	TG S2	40	Positivo
5	TG S3	90	Positivo
6	TG S4	30	Positivo
7	TG S5	50	Positivo

A presença dos parasitos foi verificada inicialmente em áreas de rompimento do tapete celular, aparecendo pequenos espaços na monocamada e restos celulares no meio de cultivo. Os protozoários também foram observados soltos no meio extracelular, em pequena quantidade e de forma esférica. A multiplicação dos parasitos nas células Vero ocorreu de maneira lenta produzindo efeitos citopáticos de destruição gradativa na monocamada (figura 1).

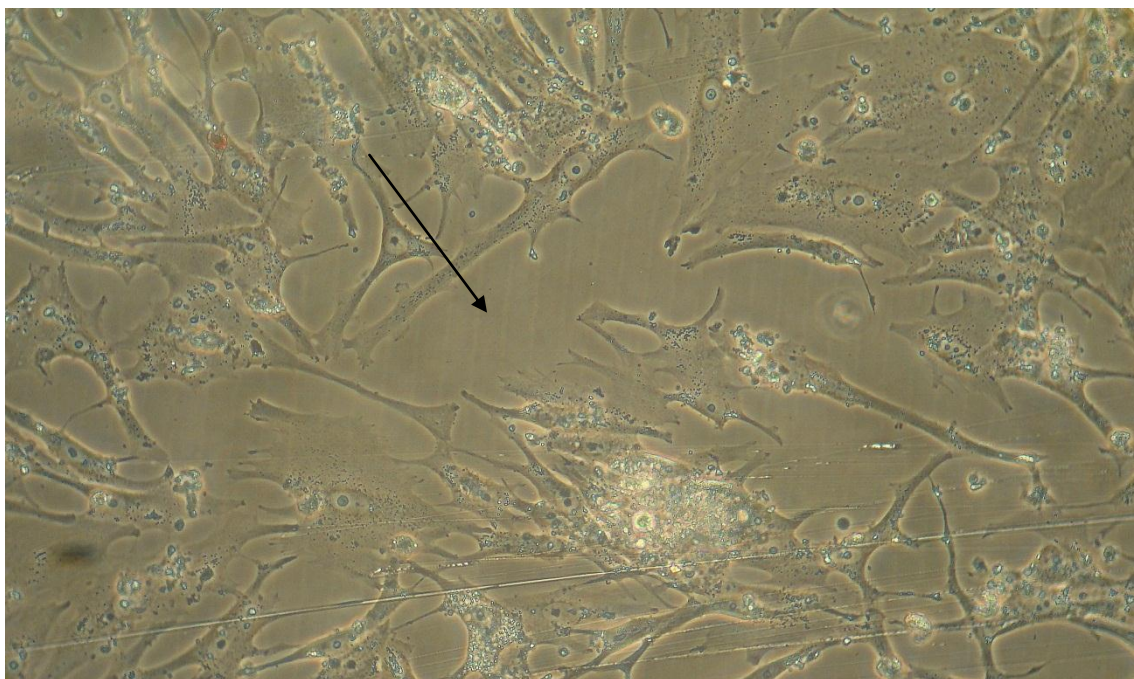


Figura 1 - Monocamada de célula Vero infectada com o isolado NC S1 (PR). Presença de efeito citopático com áreas de rompimento celular (seta). Microscópio invertido (200 X).

Foram observados os estágios de taquizoítas pequenos em forma esférica, de multiplicação lenta e com motilidade. Os protozoários foram observados isolados e em duplas.

Foram mantidos em cultivo trinta e três frascos Roux de 40 ml contendo uma monocamada de célula Vero, inoculados com amostras de sêmen (três frascos por amostra), e doze frascos de célula Vero não inoculados, como controle negativo.

Nos frascos de controle negativo contendo a monocamada de células Vero (figura 2) não foram observados protozoários durante o período de isolamento.

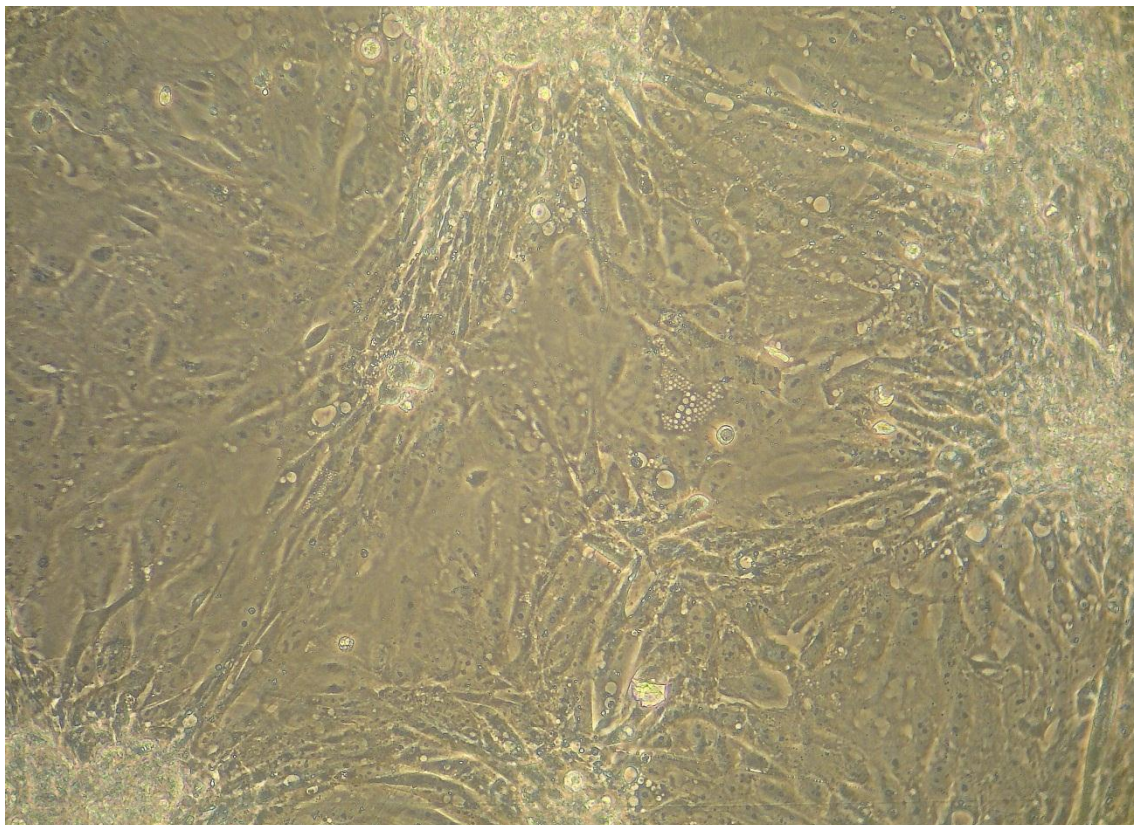


Figura 2 - Monocamada de células Vero mantida como controle negativo durante o período de isolamento *in vitro* dos protozoários (200 X).

Nas preparações com o tapete celular das garrafas de Roux inoculadas, fixados e corados com o método de May-Grunwald-Giemsa os taquizoítas foram observados pelo microscópio óptico na imersão (1000X) com o citoplasma azulado e núcleo basofílico, dentro do citoplasma das células Vero próximo ao núcleo.

3.4 Caracterização dos isolados pela reação da polimerase em cadeia – PCR

As quantidades de DNA obtidas das amostras de sêmen e isolados em cultivo estão na Tabela 7. A baixa quantidade de DNA no sêmen íntegro é devido ao pequeno volume de amostra obtido no ejaculado, que variou entre 0,8 a 2,0 ml.

Tabela 7 – Quantidades de DNA obtidas de amostras de sêmen íntegro de cães e do sedimento do isolamento em cultivo celular (aparelho NanoDrop 1000 Thermo Scientific®).

CÃES	SÊMEN ÍNTEGRO (ng/μl)	ISOLADOS DE CULTIVO CELULAR (ng/μl)
1	11,0	179,8
2	5,5	150,0
3	18,6	-
4	10,0	19,0
5	5,0	116,2
6	5,5	11,5
7	6,0	18,0
8	8,0	11,2
9	6,4	51,2
10^a	11,3	22,7
11^a	5,1	13,1
1^b	5,5	-
3^b	6,4	-
4^b	4,6	107,5
8^b	5,8	20,5

^b Recoletas de sêmen após 180 dias. ^a Cães soronegativos para ambos os protozoários.

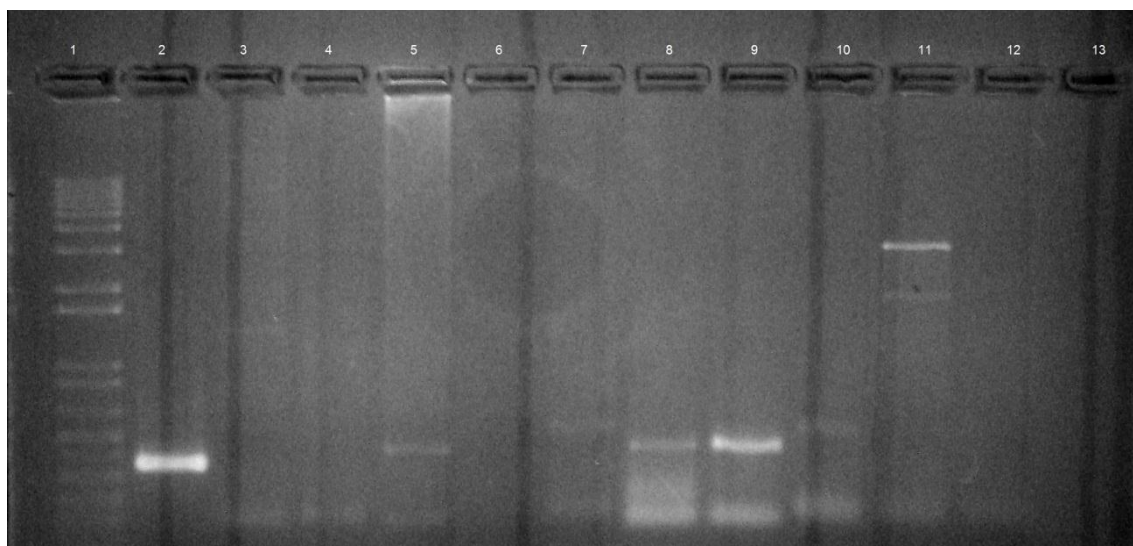
Os pares de *primers* Np6/Np21 permitiram amplificar fragmentos em três amostras de sêmen de cão (cão 2, 3 e 4), duas amostras de isolamento em cultivo de células Vero (amostra do cão 1 e 2) e para o controle positivo (cepa NC-1 de *N. caninum* de referência) (Tabela 8). Os produtos de amplificação não foram obtidos com as amostras de DNA das células Vero e da água como controle negativo (Figura 3).

Tabela 8 – Resultados sorológicos para *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (RIFI 1:50) e da PCR em amostras de sêmen íntegro de cão e sedimento dos isolados obtidos em cultivo de célula Vero.

CÃES	<i>Toxoplasma gondii</i> NO SÊMEN ÍNTEGRO	<i>Toxoplasma gondii</i> ISOLADO EM CULTIVO CELULAR	<i>Neospora caninum</i> NO SÊMEN ÍNTEGRO	<i>Neospora caninum</i> ISOLADO EM CULTIVO CELULAR	Anticorpo IgG anti-
1	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	<i>T. gondii</i>
2	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	<i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>
3	Negativo	*	Positivo	*	<i>N. caninum</i>
4	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	<i>T. gondii</i> e <i>N. caninum</i>
5	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>T. gondii</i>
6	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>T. gondii</i>
7	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	<i>N. caninum</i>
8	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>N. caninum</i>
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>T. gondii</i>
10 ^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11 ^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1 ^b	Negativo	*	Negativo	*	<i>T. gondii</i>
3 ^b	Negativo	*	Negativo	*	<i>N. caninum</i>
4 ^b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8 ^b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

* Não realizado isolamento. ^b Recoletas de sêmen após 180 dias. ^a Cães soronegativos para ambos os protozoários.

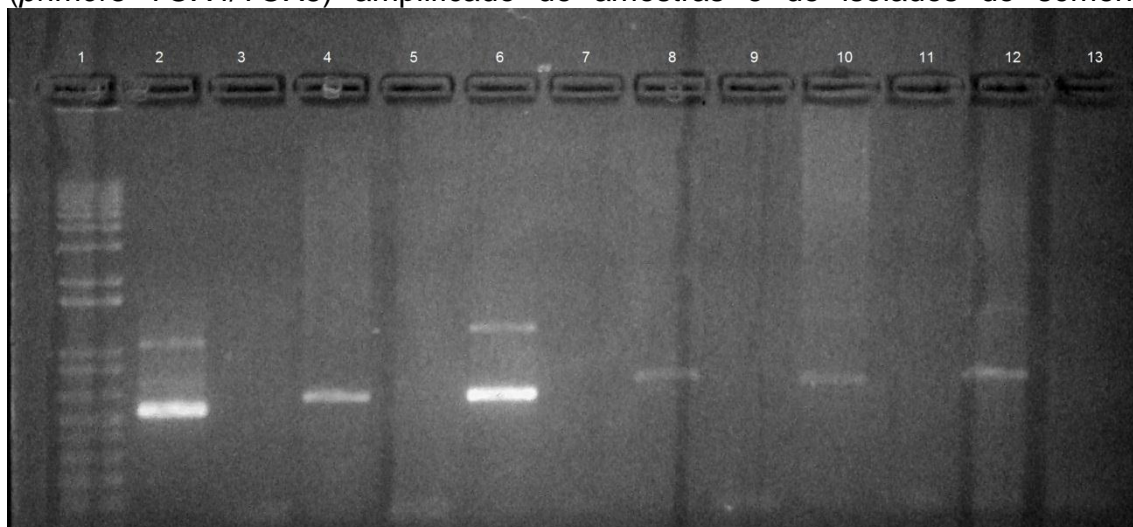
Figura 3 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *N. caninum* (*primers* Np6/Np21) amplificado de amostras de sêmen de cães e de isolados do sêmen.



1 – Marcador molecular Ladder 1 kb plus DNA; 2 – cepa referência NC-1 de *N. caninum*; 3 – células Vero; 4 – sêmen (1); 5 – NC S1 (PR); 6 – sêmen(1*); 7 – sêmen (2); 8 – NC S2 (SC); 9 – sêmen (3); 10 – sêmen (4); 11 – cultivo do sêmen (4); 12 – sêmen (5); 13 – H₂O (controle negativo);

Os pares de *primers* TOX4/TOX5 produziram fragmentos amplificados em cinco amostras de material de isolamento em cultivo de células Vero e para o controle positivo (cepa RH de *T. gondii* de referência) (Tabela 8). Os produtos de amplificação não foram obtidos com as amostras de DNA das células Vero e da água como controle negativo (Figura 4).

Figura 4 – Figura representativa dos produtos de PCR separados em gel de agarose e corado com safer®, indicando a presença do DNA de *T. gondii* (primers TOX4/TOX5) amplificado de amostras e de isolados do sêmen.



1 – Marcador molecular Ladder 1 kb plus DNA; 2 – cepa referência RH de *T. gondii*; 3 – sêmen (2); 4 – *T. gondii* (2); 5 – sêmen (6); 6 – *T. gondii* (6); 7 – sêmen (4); 8 – *T. gondii* (4); 9 – sêmen (5); 10 – *T. gondii* (5); 11 – sêmen (7); 12 – *T. gondii* (7); 13 – H₂O (controle negativo);

3.5 Análise das sequências nucleotídicas da região ITS1

Foi obtido uma sequência do produto de amplificação da região ITS1 da amostra do isolado em cultivo celular do sêmen do cão 6, compatível com *Toxoplasma gondii* (98%).

Tabela 9 – Sequência obtida do produto de amplificação da região ITS1 com o primer ITS2.

ISOLADO	SEQUENCIA
TG S4	GGGGCAGCCCCTTGGGCTGAGATTTAAATAACTTATAGTTT AGGAAGCATTCTGAAAGCACATCGAGAGAGATGCAGAAAG ATACAATCTTTCACTCTCTCTCAATGTTCTCAGATTTGTTG TTTGAAATAACGGTGTGGGAAAAAAGAATGCACACTGAAGA AACTCCTGGAAATCAGTATCCCAACAGAGACACGAATTTCC AGAAATTGAGCCCCTTCGCTGTGCACCCCCGGATACCTGC ACTGGCTTCCAATATTGGAAGCAGCGCAGGATATCCAACAT GAAGAAGGCAATAATACCTTTTCGATACTATCACGCTTCTTG AATGCAAATCTCTCCAATGGAGAGAGATGCAAACATCATGTT CTGCTTGGGATTCAAAGGTTGATGGTTAATAAAGAATAAGG ACGTGTGAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCT TGTTACGACTTTTACTTCCACCTTGTTACGACTTTTACTTCC

4 DISCUSSÃO

Das vinte e duas amostras de soro de cães utilizados para a triagem através da RIFI, 13,63% apresentaram anticorpos anti-*N. caninum*, 18,18% anti-*T. gondii* e 9,09% anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii*. FRIDLUND-PLUGGE *et al.* (2011) e ZULPO *et al.* (2012) encontraram alta ocorrência de anticorpos IgG contra estes dois agentes em cães do Paraná, sendo 18,17% positivos para *N. caninum* e 50,89% positivos para *T. gondii*. Em cães da região rural no Paraná, a prevalência de anticorpos contra *T. gondii* foi de 84,1% (GARCIA *et al.*, 1999) e contra *N. caninum* de 25,38% (FRIDLUND-PLUGGE *et al.*, 2011). Em Santa Catarina, MOURA *et al.* (2011) encontraram prevalência de 12,3% de cães soropositivos para *N. caninum* e 22,3% para *T. gondii*. Estes estudos demonstram a importância da neosporose e toxoplasmose nestas regiões e para estes animais.

A citologia demonstrou não ser uma boa técnica para diagnóstico da presença dos parasitos *N. caninum* e *T. gondii* no sêmen devido à rara presença de estruturas similares à forma do protozoário e pela difícil diferenciação. Não há trabalhos relatando a pesquisa citológica destes parasitos no sêmen.

O estágio dos parasitos *N. caninum* e *T. gondii* visualizados pelo microscópio invertido durante o isolamento em cultivo de célula Vero demonstram ser taquizoíta devido às formas (esféricos e em arco) observadas. O crescimento dos isolados em cultivo foi lento, como no trabalho de LOCATELLI-DITTRICH *et al.* (2004), que isolaram *N. caninum in vitro* de feto bovino no Paraná. O tempo de isolamento do *N. caninum* foi de 10 e 30 dias, diferente de outros trabalhos que variaram de 60-77 dias (REITEROVÁ *et al.*, 2011; BIEN *et al.*, 2010). O isolamento de *T. gondii* ocorreu entre 10 e 90 dias, mas outros trabalhos que isolaram o protozoário de outros tecidos relataram que o aparecimento de estruturas no cultivo variou de 2 a 32 dias (WAAP *et al.*, 2006; MILLER *et al.*, 2000). O isolamento de *N. caninum* e *T. gondii* em cultivo de células Vero demonstrou a viabilidade dos protozoários e o aumento da quantidade de DNA para detecção do protozoário na técnica de PCR.

Os dois isolados de *N. caninum* (NC S1 e NC S2) foram confirmados na PCR da região Nc5 do DNA do parasito, confirmando o diagnóstico, porque essa região é específica para o parasito (YAMAGE *et al.*, 1996).

Na PCR, foram positivos para *N. caninum* quatro amostras (36% - 4/11), sendo três de cães soropositivos e um soronegativo. Duas amostras foram positivas para *N. caninum* no material coletado do isolamento *in vitro*. Os cães não apresentaram DNA de *N. caninum* na segunda coleta de sêmen analisada (Tabela 7), demonstrando que a eliminação do parasito é esporádica. ORTEGA-MORA *et al.* (2003) comprovaram que *N.caninum* pode ser eliminado esporadicamente no sêmen fresco e industrializado de touros sororeagentes pela técnica de nested-PCR.

FERRE *et al.* (2005) tentaram o isolamento *in vivo* de *N. caninum* de sêmen de touros naturalmente infectados inoculando em camundongos, mas não obtiveram sucesso.

A técnica de PCR realizada no presente trabalho obteve bom resultado e pode ser utilizada para detecção de *N. caninum* no sêmen de cães, ao contrário do trabalho de PITUCO *et al.* (2005) que analisaram 1.124 partidas de sêmen de touros soropositivos e nenhuma amostra demonstrou a presença do DNA de *N. caninum* com a PCR convencional, somente com a nested-PCR, a qual é mais empregada nos trabalhos com sêmen de bovinos (CAETANO-DA-SILVA *et al.*, 2004; FERRE *et al.*, 2005; ORTEGA-MORA *et al.*, 2003) demonstrando maior sensibilidade, de 1 a 10 parasitos/ml de sêmen. SHARIFZADEH *et al.* (2012) detectaram a presença de DNA de *N.caninum* em 30 das 175 amostras de sêmen bovinos no Irã, analisadas através da técnica de PCR convencional

Não deve ser descartada a possibilidade da presença do parasito no sêmen de cães com amostras negativas na técnica de PCR, pois segundo ORTEGA-MORA *et al.* (2003) componentes inibitórios do sêmen podem reduzir a sensibilidade da técnica de PCR e a maior incidência de DNA de *N. caninum* no material de isolamento em cultivo celular se deve à baixa quantidade do parasito no sêmen. No trabalho de SERRANO-MARTINEZ *et al.* (2007) com

bovinos experimentalmente infectados, encontraram uma taxa de 0,1 a 14,5 parasitos/ml, o que indica uma quantidade muito pequena eliminada no sêmen.

O cão 1 positivo na sorologia para *T. gondii* apresentou DNA de *N. caninum* no isolado do sêmen, e o cão 7 positivo na sorologia para *N. caninum* apresentou DNA de *T. gondii* no isolado do sêmen, demonstrando que animais soronegativos podem estar eliminando o parasita.

Na PCR para pesquisa de *T. gondii*, das onze amostras analisadas cinco (45% - 5/11) apresentaram a presença do protozoário no material de isolamento em cultivo de células Vero, sendo quatro soropositivos e um soronegativo para o protozoário. Os cães não apresentaram presença do protozoário no sêmen na segunda coleta, demonstrando que a eliminação do parasito é esporádica.

Foram obtidos cinco isolados de *T. gondii* do sêmen de cães. A PCR para *T. gondii* com os *primers* TOX4/TOX5 confirmou o diagnóstico. A região ITS1 foi sequenciada com sucesso para o isolado TG S4. Verificou-se homologia dessa região com a sequência de *T. gondii* depositadas no GenBank®.

ARANTES *et al.* (2009) isolaram *T. gondii in vivo* do sêmen de cinco dos seis cães experimentalmente infectados e em todos os cães foi detectado a presença do *T. gondii* em fragmentos do testículo e epidídimo através da técnica de imunohistoquímica.

O isolamento de *T. gondii* do sêmen de outras espécies já foi realizado *in vivo* por DUBEY e SHARMA (1980), que isolaram *T. gondii* do sêmen de caprinos, LOPES *et al.* (2009) isolaram do sêmen de ovinos, SCARPELLI *et al.* (2009) e MOURA *et al.* (2007) isolaram do sêmen de touros e suínos, respectivamente, originando discussões sobre possível transmissão venérea do parasito.

Este resultado demonstra que a quantidade de DNA do parasito no sêmen é pequena, pois foi obtido produto somente do material isolado. Segundo HOMAN *et al.* (2000), esse *primer* é específico para *T. gondii* e tem

alta sensibilidade, demonstrando produto de PCR em amostras com diluição de até quatro taquizoítas.

5 CONCLUSÃO

Em cães clinicamente saudáveis e naturalmente infectados provenientes da região metropolitana e rural dos estados do Paraná e Santa Catarina, foram detectados *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* viáveis no sêmen através das técnicas de isolamento *in vitro* e PCR.

O sequenciamento genético confirmou a presença do DNA de *Toxoplasma gondii* no material de isolamento do sêmen de cão sadio e sorologicamente positivo para o protozoário.

Cães soronegativos podem eliminar *N. caninum* e *T. gondii* no sêmen, e cães soropositivos podem não eliminar.

A análise citológica não é uma técnica eficaz na pesquisa de protozoários no sêmen, é necessário multiplicação dos protozoários *in vitro* e diagnóstico molecular.

6 PERSPECTIVAS

É necessário fazer mais estudos sobre:

- O papel epidemiológico dessa via de eliminação quanto à eficiência reprodutiva em fêmeas;
- A viabilidade dos protozoários em sêmen congelado em palhetas para utilização na inseminação artificial (IA);
- Estudar a localização do *Neospora caninum* no aparelho reprodutor masculino;
- Estudar a frequência e a quantidade de parasitos eliminados no ejaculado através da técnica de PCR-real time.

- Realizar análise do isolado de *T. gondii* com microsátélites; identificar a linhagem do parasito e avaliar a sua virulência em camundongos.

REFERÊNCIAS

ARANTES, T.P.; LOPES, W.D.Z.; FERREIRA, R.M.; PIERONI, J.S.P.; PINTO, V.M.R.; SAKAMOTO, C.A.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii*: Evidence for the transmission by semen in dogs. **Experimental Parasitology**, v. 123, p. 190–194, 2009.

BIEN, J.; MOSKWA, B.; CABAJ, W. *In vitro* isolation and identification of the first *Neospora caninum* isolate from European bison (*Bison bonasus bonasus* L.). **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3-4, p. 200-205, 2010.

BLEWETT, D.A.; TEALE, A.J.; MILLER, J.K.; SCOTT, G.R.; BUXTON, D. Toxoplasmosis in rams: Possible significance of venereal transmission. **Veterinary Record**, v. 24, p. 73–77, 1982.

CAETANO-DA-SILVA, A.; FERRE, I.; FERNANDEZ, E.C.; NAVARRO, V.; ADURIZ, G.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L.M. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 62, p. 1329–1336, 2004.

CAMARGO, M.E. Introdução às técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, p.143-171, 1974.

DUBEY, J.P.; SHARMA, S.P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 5, p. 794–795, 1980.

DUBEY, J.P.; HATTEL, A.L.; LINDSAY, D.S.; TOPPER, M.J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 10, p. 1259-1263, 1988.

DUBEY, J.P.; LIDDELL, S.; MATTSON, D.; SPEER, C.A.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 345-353, 2001.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L. M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; LAPPIN, M.R. Toxoplasmosis and other intestinal coccidial infections in cats and dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, 1009-1034, 2009.

DUBEY, J. P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals the last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, n.1-2, p.90-108, 2011.

FERRE, I., ADURIZ, G., DEL POZO, I., CERRILLO, J.R., ATXAERANDIO, R., FERNÁNDEZ, E.C., HURTADO, A., GARAGALZA, C.U., ORTEGA-MORA, L.M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1504-1518, 2005.

FRIDLUND-PLUGGE, N.; FERREIRA, F.M.; RICHARTZ, R.R.; de SIQUEIRA, A.; DITTRICH, R.L. Occurrence of antibodies against *Neospora caninum* and/or *Toxoplasma gondii* in dogs with neurological signs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 202-206, 2011.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R.C. Seroepidemiology of Toxoplasmosis in cats and dogs from rural properties of Jaguapitã County, Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 29, n. 1, p. 99-104, 1999.

GONDIM, L.F.P.; LASKI, P.; GAO, L.; McALLISTER, M.M. Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of *Neospora caninum*. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 119-122, 2004.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. **Quarterly Review of Biology**, Ithaca, v.66, n.4, p.411-453, 1991.

HOMAN, W.L.; VERCAMMEN, M.; BRAEKELLER, J.D.; VERSCHUEREN, H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 pb DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 69-75, 2000.

LOCATELLI-DITTRICH R. Diagnóstico sorológico, isolamento, cultivo e caracterização molecular de *Neospora caninum* em bovinos leiteiros e em equinos no Estado do Paraná, Brasil. **Tese** (Doutorado em Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2002.

LOCATELLI-DITTRICH, R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RICHARTZ, R.R.T.B.; GASINO-JOINEAU, M.E.; VINNE, R.V.D.; PINCKNEY, R.D. Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho leiteiro no Paraná. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n. 3, p. 103-109, 2004.

LOPES, W.D.Z.; COSTA, A.J.; SANTANA, L.F.; SANTOS, R.S.; ROSSANESE, W.M.; LOPES, W.C.Z.; COSTA, G.H.N.; SAKAMOTO, C.A.; SANTOS, T.R. Aspects of Toxoplasma Infection on the Reproductive System of Experimentally Infected Rams (*Ovis Aries*). **Journal of Parasitology Research**, article ID 602803, 2009.

MARSH, A.E.; BARR, B.C.; PACKHAM, A.E.; CONRAD, P.A. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). **Journal of Parasitology**, v.84, p. 983-991, 1998.

MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J.; MAYER, R.; SANCHEZ, S.; NISTAL, M. Protozoan infections in the male genital tract. **Journal of Urology**, v. 156, p. 340-349, 1996.

MILLER, D.; DAVIS, J.; ROSA, R.; DIAZ, M.; PEREZ, E. Utility of tissue culture for detection of *Toxoplasma gondii* in vitreous humor of patients diagnosed with toxoplasmic retinochoroiditis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3840-2.

MORAES, E.P.B.X.; FARIA, E.B.; BATISTA, A.M.; FREITAS, A.C.; SILVA, J.C.R.; ALBUQUERQUE, P.P.F.; MOTA, R.A. Detecção de *Toxoplasma gondii* no sêmen de ovinos naturalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 11, p. 915-917, 2010.

MORETTI, L.D.; UENO, T.E.; RIBEIRO, M.G.; AGUIAR, D.M.; PAES, A.C.; PEZERICO, S.B.; SILVA, A.V. Toxoplasmosis in distemper vírus infected dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 85-91, 2002.

MOURA, A.B.; COSTA, A.J.; FILHO, J.S.; PAIM, B.B.; PINTO, F.R.; DI MAURO, D.C. *Toxoplasma gondii* in semen of experimentally infected swine. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p.430–434, 2007.

MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; TEIXEIRA, E.B.; PISETTA, G.M.; JUNIOR, A.H. Ocorrência de anticorpos e fatores de risco para infecção por *Toxoplasma gondii* em cães, nas cidades de Lages e Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Online)**, v. 18, n. 3, p. 52-56, 2009.

MOURA, A.B.; SOUZA, A.P.; SARTOR, A.A.; BELLATO, V.; PISETTA, G.M.; TEIXEIRA, E.B.; JUNIOR, A.H. Anticorpos contra *Neospora caninum* e fatores de risco em cães de Lages e Balneário Camboriú, SC. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 262-265, 2011.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERRE, I.; DEL-POZO, I.; CAETANO-DA-SILVA, A.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; REGIDOR-CERRILLO, J. Detection of *Neospora caninum* in sêmen of bulls. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 301–8, 2003.

PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H.; FAVA, C.D.; STEFANO, E.; SHIMOZONO, O.S.; CAMARGO, N.T.C.; GALETTI, M.C.T.; OLIVEIRA, L.H. Pesquisa de *Neospora caninum* em sêmen de touros de Centrais de Inseminação Artificial do Brasil. Anais - I Fórum Brasileiro de estudos sobre *Neospora caninum*, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, USP, 2005.

REITEROVÁ, K.; SPILOVSKA, S.; COBADIOVÁ, A.; MUCHA, R. First *in vitro* isolation of *Neospora caninum* from a naturally infected adult dairy cow in Slovakia. **Acta Parasitologica**, v. 56, n. 2, p. 111-115, 2011.

SABIN, A.B. & OLITSKY, P.K. Toxoplasma na obligate intracelular parasitismo. **Science**, v. 85, p. 336-338, 1937.

SCARPELLI, L.C.; LOPES, W.D.Z.; MIGANI, M.; BRESCIANI, K.D.S.; COSTA, A.J. *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 59-64, 2009.

SERRANO-MARTINEZ, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MOTA, R.A.; MARTÍNEZ, A.; DEL-POZO, I.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. **Theriogenology**, v. 67, p. 729-737, 2007.

SHARIFZADEH, A.; DOOSTI, A.; DEHKORDI, P.G.; PCR Assay for Detection of *Neospora Caninum* in Fresh and Frozen Semen Specimens of Iranian Bulls. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 6, p. 742-749, 2012.

SPENCE, J.B.; BEATTIE, J.; FAULKNER, L.; WATSON, W.A. *Toxoplasma gondii* in the semen of rams. **Veterinary Record**, v. 102, p. 38-39, 1978.

SYED-HUSSAIN, S.S.; HOWE, L.; POMROY, W.E.; WEST, D.M.; SMITH, S.L.; WILLIAMSON, N.B. Detection of *Neospora caninum* DNA in semen of experimental infected rams with no evidence of horizontal transmission in ewes. **Veterinary Parasitology**, v. 197, Issues 3-4, p. 534-542, 2013.

TEALE, A.J.; BLEWETT, D.A.; MILLER, J.K.; BUXTON, D. Experimentally induced toxoplasmosis in young rams: The clinical syndrome and semen secretion of *toxoplasma*. **Veterinary Record**, v. 17, p. 53-55, 1982.

WAAP, H.; ANGELO, H.; VILARES, A.; CORTES, H.; MEIRELES, J.; LEITÃO, A. Isolamento de *Toxoplasma gondii* a partir de cérebro e músculo de gatos sorologicamente positivos utilizando culturas celulares. **V Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias**, pôster 98, p. 217, 2011.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR protocols, a guide for methods and applications**, Academic Press, p. 315-322, 1990.

YAMAGE, M.; FLECHTNER, O.; GOTTSTEIN, B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide *primers* for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 272-279, 1996.

ZULPO, D.L.; LEITE, J.H.A.C.; CUNHA, I.A.L.; BARROS, L.D.; TARODA, A.; JUNIOR, V.E.C.; SANTOS, H.L.E.P.L.; GARCIA, J.L. Occurrence of anti-*Leishmania spp*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dog sera from Veterinary Hospital from Universidade Estadual de Londrina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1897-1906, 2012.

ANEXOS

Anexo A

Reação da Imunofluorescência Indireta para pesquisa de anticorpos contra *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*.

Material: lâminas para imunofluorescência com 10 orifícios cada, sensibilizadas com taquizoítas de *N. caninum* e *T. gondii*. Conservação: - 20°C.

Em cada lâmina além dos soros testes foram incluídos os soros controles positivo e negativo.

Técnica:

Identificar as lâminas na parte polida e anotar as amostras em protocolo controle;

Diluir as amostras de soro com PBS pH 7,2;

Retirar as lâminas do congelador e secar sob ventilação por 10 minutos;

Colocar 25 µl de cada amostra de soro diluído nos orifícios (poços) da lâmina;

Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida;

Lavar com PBS por 10 minutos nas cubas;

Lavar com água destilada;

Secar;

Colocar o conjugado específico (25µl/poço) – utilizado conjugado anti-IgG Sigma™;

Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida;

Lavar com PBS por 10 minutos nas cubas;

Lavar com água destilada por 5 minutos;

Secar;

Colocar a glicerina 90% (tamponada com PBS) entre as duas fileiras de orifícios e colocar uma lamínula;

Examinar as lâminas no microscópio de imunofluorescência.

Anexo B

Isolamento de *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* de amostras de sêmen canino.

Coleta de sêmen total em tubos estéreis;

Colocar 200 µl de sêmen fresco íntegro em garrafa de cultivo celular com monocamada de células Vero de 24 horas;

Incubar na estufa de CO₂ na temperatura de 37°C por 3 horas;

Remover a suspensão e fazer a troca do meio, acrescentando 5 ml de meio de manutenção Eagle 2% SFB;

Examinar o cultivo diariamente no microscópio invertido para observar os efeitos citopáticos na monocamada e os parasitos;

*Meio de manutenção Eagle:

Meio Eagle (Meio Essencial Mínimo de Eagle – MEM) suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina G potássica, 100µg/ml de sulfato de estreptomicina e 1,25µg/ml de anfotericina B.

O meio Eagle em pó mantido na geladeira foi preparado periodicamente na quantidade de 2 litros sendo esterilizado em seguida (filtro de 0,22µm). A suplementação do meio foi realizada adicionando os suplementos assepticamente em 250 a 500 ml de meio estéril.

Anexo C

Técnica para obtenção de parasitos para extração de DNA, visando a reação da polimerase em cadeia (PCR), do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFPR.

Após a infecção de 90 a 100% da monocamada de células Vero, retirar os parasitos com haste de borracha e/ou tripsina;

Transferir a suspensão para tubos de Falcon estéreis de 50 ml;

Centrifugar a 1.100 g por 10 minutos a 4°C;

Retirar o sobrenadante e lavar o sedimento com solução de cloreto de sódio a 0,9%;

Centrifugar novamente a 1.100 g por 10 minutos a 4°C;

Desprezar o sobrenadante e recuperar o sedimento transferindo para microtubos estéreis;

Armazenar no freezer a – 20°C.

Anexo D

Extração com PureLink® Genomic DNA Kit da Invitrogen™

Adicionar 200 µl de PBS, ressuspensando as células;

Adicionar 20 µl de proteinase K;

Adicionar 20 µl de RNase A, misturar rapidamente utilizando o vortex e incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;

Adicionar 200 µl de PureLink® Genomic Lysis e misturar em vortex para obter uma solução homogênea;

Incubar a 55°C durante 10 minutos para promover a digestão das proteínas;

Adicionar 200 µl de etanol 96-100% e misturar bem com vortex durante 5 segundos para obter uma solução homogênea;

Colocar o material (~640 µl) na coluna de rotação (PureLink® Spin Column);

Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto;

Descartar o tubo coletor contendo o líquido filtrado pela coluna e rotação e colocar a coluna em novo tubo de coleta para as próximas 2 lavagens;

Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 1 previamente preparado com etanol;

Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 1 minuto;

Descartar o tubo de coleta novamente e colocar a coluna de rotação em um tubo de coleta novo;

Adicionar 500 µl de tampão de lavagem 2 previamente preparado com etanol;

Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 9.800 g por 3 minutos;

Descartar o tubo de coleta novamente;

Colocar a coluna de rotação em microtubo estéril e identificado;

Adicionar 25 – 200 µl de tampão de eluição genômica PureLink® na coluna de rotação; (Utilizado 100 µl)

Incubar à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a coluna a 9.800 g por 1 minuto à temperatura ambiente; (neste tubo contém DNA genômico purificado)

Para recuperar mais DNA pode realizar um segundo passo do item 17, fazendo nova centrifugação com o tampão de eluição genômica PureLink®;

Armazenar o DNA purificado a – 20°C.

Anexo E

Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Na PCR foi preparado um mix de acordo com a Tabela 4 e a Tabela 5. O volume da reação foi de 25 µl.

Técnica da PCR:

Preparar o mix em fluxo laminar de acordo com o número de amostras de DNA, considerando o tubo branco;

Adicionar os componentes da reação em microtubos na sequência apresentada até a Taq polimerase. Manter os reagentes do mix no gelo e adicionar por último a enzima Taq polimerase. Preparar um tubo branco;

Homogeneizar o mix no microtubo em vortex (30 segundos);

Distribuir as alíquotas determinadas do mix nos microtubos para PCR;

Acrescentar as amostras de DNA;

Homogeneizar cada tubo em vortex (2 segundos) após colocar a amostra;

Incubar as amostras no termociclador;

A amplificação no termociclador Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler® foi realizada com o seguinte programa:

Primers Np6/Np21

94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	35 segundos	} 32 ciclos
54°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

Primers TOX4/TOX5

94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	35 segundos	} 32 ciclos
65°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

Primers ITS5/ITS2

94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	35 segundos	} 30 ciclos
57°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	1 ciclo
4°C	∞	

Após a amplificação os produtos foram analisados por eletroforese (Anexo F).

Anexo F

Eletroforese em gel de agarose 1,4%

Preparar o gel de agarose (UltraPure™ Agarose - Invitrogen®) a 1,4% em tampão TAE 1X;

Colocar a agarose na cuba com o pente. Após solidificar retirar o pente com cuidado;

Acrescentar o tampão TAE 1X (800 ml) na cuba com o gel solidificado;

Distribuir alíquotas de 1,5 µl do corante Safer Dye Kasvi® sobre um parafilme em numero igual ao das amostras;

Misturar 5 µl de cada amostra ao Safer Dye Kasvi® e depositar nos poços do gel, iniciando com o marcador de pares de bases (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen 250ug (1,0ug/ul);

Conectar os cabos da fonte de eletroforese na cuba DIGEL® JY-SPCT, proceder a eletroforese a 95V utilizando a fonte Thermo Scientific® EC300XL, migrando do polo negativo (preto) para o positivo (vermelho);

Desligar após migração de 2/3 da cuba;

Retirar o gel da cuba e fazer leitura em transiluminador de ultravioleta (Loccus biotecnologia® LTB-20x20ST) e fotografar.

*Tampão TAE – Tris acetato na solução concentrada 50X:

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
q.s.p	1.000 ml

Manter na geladeira e no momento do uso diluir para 1X com água destilada. A solução de uso apresenta as concentrações 0,04 M de Tris acetato e 0,001 M de EDTA.

Anexo G

Coloração May-Grunwald-Giemsa

Diluir o corante Giemsa: 40 gotas de Giemsa para 30 ml de água destilada em quantidade suficiente para cobrir todas as lâminas;

Cobrir a(s) lâmina(s) com o corante May-Grunwald e deixar por 2 minutos;

Jogar água destilada sobre o corante e aguardar mais 1 minuto;

Tirar todo o corante e utilizar o preparo da etapa 1, aguardar 15 minutos;

Lavar e secar a(s) lâmina(s).

Anexo H

Reagentes para amplificação na reação de PCR e reconstituição dos *primers*, descrito abaixo:

H₂O Milli Q: A água Mili Q estéril (Ultrapure™ DEPC Treated Water - Invitrogen® by Life Technologies) distribuída em alíquotas nos microtubos e mantida congelada a – 20°C;

Taq DNA Polimerase: Enzima fornecida na concentração 500U (5U/μl) pela Invitrogen® Platinum Taq DNA Polymerase, sendo armazenada a – 20°C;

Tampão de amplificação 10X: 10X High Fidelity PCR Buffer [600 mM Tris-SO₄ (pH 8,9), 180 mM Ammonium Sulfate] da Invitrogen®, mantido a – 20°C;

Cloreto de Magnésio: MgCl₂ a 50 mM da Invitrogen®;

Mistura de nucleotídeos – dNTPs: Os quatro nucleotídeos: dATP, dCTP, dGTP e dTTP foram fornecidos em uma solução ou mix na concentração de 100 mM (Invitrogen®), desta solução estoque foi preparada a solução de uso com H₂O Mili Q para uma concentração de 25 mM. As soluções foram mantidas a – 20°C;

Primers: Os *primers* foram sintetizados pela Induslab Com. de Prod. para Laboratório Ltda. e fornecidos liofilizados pela Invitrogen®. As especificações dos *primers* encontram-se na Tabela 2. Dos *primers* liofilizados foram preparadas as soluções estoque na concentração de 50 mM. Da solução estoque foram preparadas as soluções de uso a 25 mM. A reconstituição dos *primers* foi realizada em fluxo laminar conforme a seguinte técnica:

A reconstituição dos *primers* foi realizada assepticamente, em fluxo laminar conforme a seguinte técnica:

Centrifugação dos *primers* liofilizados por 30 segundos a 380 g;

Adiciona-se a quantidade de H₂O Mili Q suficiente para obter a concentração de 200µM;

Deixar 24 horas na geladeira para dissolver completamente, a 4°C;

Antes de preparar as soluções de uso, homogeneizar três a quatro vezes a solução estoque, cuidadosamente;

Centrifugar por 30 segundos a 380 g;

Para o preparo das soluções de uso adicionar a H₂O Mili Q e depois a quantidade do *primer* e homogeneizar;

Conservar as soluções de estoque e de uso a - 20°C;

Anexo I

Purificação para reação de sequenciamento:

- Em tubo de 500µl adicionar 45 µl do produto de PCR
- Adicionar 30 µl de acetato de amônio 7,5M
- Adicionar 90 µl de etanol absoluto e homogeneizar em vortex
- Centrifugar 12.500 g por 20 minutos a temperatura ambiente e em seguida descartar o sobrenadante, usando micropipeta e colocando a ponteira do lado oposto ao pellet
- Adicionar lentamente 200 µl de etanol 70%
- Centrifugar a 12.500 g por 15 minutos a temperatura ambiente e descartar o sobrenadante
- Secar em estufa a 37°C por 15 minutos
- Dissolver o DNA em 20 µl de água ultrapura. Deixar em repouso por 15 minutos para completa dissolução
- Fazer eletroforese em gel de agarose com 3 µl do DNA purificado.